



TITLE:

トマトにおける単為結果果実の誘導および発達に関する研究: 生長調節物質の関与と偽胚形成(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

片岡, 圭子

CITATION:

片岡, 圭子. トマトにおける単為結果果実の誘導および発達に関する研究: 生長調節物質の関与と偽胚形成. 京都大学, 2004, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2004-05-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r11496>

RIGHT:

トマトにおける単為結果果実の誘導および発達に関する研究
—生長調節物質の関与と偽胚形成—

2004

片岡圭子

目 次

緒言	1
第1章 ホルクロルフエニユロン (CPPU) がトマトの果実発達に及ぼす影響	4
第1節 オーキシシン誘導単為結果トマトの空どう果発生と果実発達に CPPU が及ぼす影響	6
第2節 単為結果性品種 ‘Severianin’ の果実発達に及ぼす CPPU および 外生オーキシシンの影響	19
第3節 総合考察	26
第4節 摘要	29
第2章 トマト果実の肥大と偽胚発達におけるジベレリンの役割	30
第1節 ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールが ‘Severianin’ の内生 ジベレリンおよび果実肥大に及ぼす影響	31
第2節 ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールが ‘Severianin’ の偽胚 発達に及ぼす影響	43
第3節 オーキシシン誘導単為結果果実におけるウニコナゾール及びジベレ リン処理が果実肥大と偽胚発達に及ぼす影響	50
第4節 総合考察	54
第5節 摘要	55
第3章 偽胚の発達様相と単為結果トマト果実の肥大との関係について	56
第1節 非単為結果系統トマトにおけるオーキシシン処理の時期が果実肥大 と偽胚発達に及ぼす影響	56
第2節 開花前から果実肥大を開始するトマト系統 ‘MPK-1’における偽胚 発達の様相	61
第3節 着果した後、肥大しないトマト系統 ‘HOK-12’におけるオーキシ シン処理の影響と偽胚発達の様相	65
第4節 総合考察	69
第5節 摘要	73
第4章 総括	74
謝辞	77
引用文献	78

緒言

果実は子房あるいはその近傍組織が肥大した器官であり，種子を保護する器官として発達したと考えられている．果実の肥大発達には受精胚あるいは種子の存在が必要であり，種子が生産する植物生長調節物質が果実の着果・肥大を支配しているとされている(Nitch, 1965)．一方，種子のない果実が肥大する単為結果を利用している栽培植物は少なくない．果実を利用する作物において単為結果は，環境要因に支配されやすい受粉や受精を回避することで，着果を確実にして着果数を増加させる，可食部の割合を高める，食べやすいなどの有用性がある．それだけではなく，栽培管理上，雌雄異株の作物では受粉のための雄株の栽植が不要になり，受粉を確実にするための人工授粉や訪花昆虫の管理作業を省略することができる．その有用性からこれまで多くの研究がなされており，また，単為結果を支配する遺伝子をもつ単為結果性品種や，植物成長調節物質の処理による化学調節が実用的に利用されている．

たとえば，ブドウではジベレリン処理や遺伝的単為結果能の利用があり，カキでは遺伝的な単為結果性品種が広く栽培され，果実発達初期における胚のアボーションが確認されている(岡本, 1996)．スイカでは3倍体や不稔花粉の利用が試みられている(Sugiyama and Morishita, 2000)．

トマト (*Lycopersicon esculentum*) では，合成オーキシシンによる着果促進が広く行われており，周年栽培に貢献するところが多い．4CPA (4-chlorophenoxy acetic acid) やクロキシホナック ((4-chloro-2-hydroxymethylphenoxy)acetate, HCPA) などの合成オーキシシンを開花前後の時期に花房散布することによって，子房は肥大を開始し，収穫時には受粉した果実と同様かそれ以上の大きさにまで達する(Ho and Hewitt, 1986)．この合成オーキシシン処理は，高温あるいは低温によって受粉や受精が阻害されるような栽培条件下でも安定した果実肥大を誘起することができる．ただし，高温時には効果が強く現れ，空どう果とよばれる果皮と胎座部のあいだに空隙が生じる奇形果が発生することがある(Abad and Monteiro, 1989)．この奇形は果実中のオーキシシンの比率がサイトカイニンに対して高すぎるために起こると

考えられている (Asahira et al., 1968) が、果実培養による実験では、サイトカイニンの空どう果発生に対する影響は明らかになっていない (Asahira and Hosoki, 1977).

合成オーキシンによって誘導された単為結果トマト果実では、果実肥大初期に、本来種子ができる胚嚢内に珠皮最内層の細胞が分裂して細胞塊をなし、偽胚を形成する (Asahira et al., 1968). 偽胚は果実肥大後期には退化して、赤熟期には崩壊してしまう。同様の偽胚は *pat-2* 遺伝子をもつ単為結果性品種 ‘Severianin’ においても報告されている (Lin et al., 1983). 他の植物種の単為結果果実においても、アラビドプシスでは単為結果性の *fis* 突然変異系統で、受粉なしで成長した莢果中の 1/3 から 1/2 の胚珠が種子と同じ程度に発達しており (偽種子)、発達した偽種子中には、多細胞化した胚乳組織や胚に似た組織が認められている (Chaudhury et al., 1997).

また、果実肥大はある大きさ以上になれば、自律的に進行すると考えられている。たとえばエンドウでは開花後数日で種子を刺傷してもその後の莢の成長は阻害されない (García-Martínez et al., 1991). これらのことから、着果から肥大初期にかけて果実内に活発な細胞分裂をしている組織が存在することが果実の発達に必要であるのではないかと考えられる。

本研究は、生長調節物質の制御を介して、遺伝的単為結果およびオーキシン誘導単為結果における果実発達を組織学的に観察し、果実が着果・肥大していく過程を制御している機構の一端を明らかにしようとした。

第 1 章では、合成サイトカイニンであるホルクロルフエニユロンを用い、過剰な合成オーキシンの影響下で外生的にサイトカイニンを供与することで空どう果発生抑制を試み、同時に、トマト果実発育についての形態的観察から果実発育におけるサイトカイニンの影響について検討した。

第 2 章では、ジベレリン生合成阻害剤ユニコナゾールとジベレリン (GA_3) との組み合わせ処理によって内生ジベレリンレベルを制御し、初期果実発育および偽胚発達におけるジベレリンの役割について検討した。

第 3 章では、第 2 章で見られた偽胚の発育と果実肥大の同調性に着目して、単為

結果を誘導するオーキシン処理時期を変えた場合について検討した。また、単為結果性系統‘Severianin’の後代から育成した果実肥大特性の異なる 2 系統について、果実肥大と偽胚発育との関連性を検討した。

第1章 ホルクロルフエニユロン(CPPU)がトマトの果実発達に及ぼす影響

今日、トマトは施設栽培化が進み、周年供給されている。これには施設栽培における環境制御技術の進歩だけでなく、冬季の低温や寡日照による花粉の減少および不受精に伴う果実の肥大不良といった問題点を克服する技術の発達によるところが大きい。特に合成オーキシンの花房散布は、着果・果実肥大促進に顕著な効果を示すことから冬季のみならず周年栽培において広く普及し、すでに不可欠の技術となっている。しかし、反復処理や高濃度処理などによって空どう果と呼ばれる生理障害果の発生が見られ、品質・収量の低下を招くことがある。Asahira et al.(1968)は、オーキシン誘導単為結果果実では内生サイトカイニン活性が有種子果に比較して低く、オーキシンに対するサイトカイニンの比が小さいことが空どう果の原因であることを明らかにした。また、Nawata et al.(1985)は、chlormequat chloride ((2-chloro-ethyl) trimethylammonium chloride, CCC)の根部浸漬処理、花房散布処理、地上部散布処理によって、空どう果の発生が抑制されることを報告すると同時に、CCC 根部浸漬処理によって、木部いっぴつ液のサイトカイニン活性が上昇することを明らかにし、CCC による空どう果抑制がサイトカイニンレベルの上昇によるものであることを示唆した。しかし、この CCC による空どう果発生抑制作用の機作については、サイトカイニンレベルの上昇とともにオーキシンの生合成阻害が同時に起きている可能性も考えられる (Kuraishi and Muir, 1962)。このように空どう果発生がオーキシン／サイトカイニンのアンバランスによるものであるならば外生的に合成サイトカイニンを供与することで空どう果発生を抑制しうる可能性がある。しかし、Asahira and Hosoki (1977)は、培地に BAP (6-(N-benzylamino) purine) を加えたトマト果実の試験管内培養実験によって、空どう果発生に対する BAP の明らかな効果は認められないとしている。

一方、尿素系サイトカイニンであるホルクロルフエニユロン (1-(2-chloro-4-

pyridyl)-3-phenylurea, CPPU) は、ブドウ果実の肥大促進 (工藤ら, 1987), キウイフルーツ果実の肥大促進 (田中, 1987), メロンの着果・肥大促進 (池田ら, 1990; 早田ら, 1990) およびスイカの単為結果誘導 (早田ら, 1991) などの効果をもつことが報告されており, サイトカイニン活性をもつ植物生長調節剤として実用化されている (坂, 1994). ほとんどの天然起源のサイトカイニンは N^6 -置換アデニン構造をもっているが, Shantz and Steward が 1952 年, 1,3-diphenylurea にサイトカイニン活性を見出して以来, 数多くのジフェニルウレア誘導体が作られ, その多くにサイトカイニン活性がある (岩村, 1994). CPPU は, ジフェニルウレア構造の一方のベンゼン環をピリジン環に置き換えた N-phenyl-N'-pyridylurea 誘導体のひとつであり, タバコ髄カルス生物検定法における最適濃度は $4.0 \times 10^{-9} M$ 以下で, BAP の最適濃度 $4.4 \times 10^{-8} M$ に比較すると, そのサイトカイニン活性は BAP の約 10 倍以上である (Takahashi ら, 1978).

そこで, この CPPU を用いて, まず, オーキシン誘導単為結果における CPPU による空どう果発生抑制について検討し, 得られた果実の形態的特徴を調査した. その結果, CPPU 処理によって特徴的な形態が誘導されることが明らかとなったので, さらに果実の細胞数や細胞の大きさ, 果梗部の肥大様相について光学顕微鏡による観察を行った. さらに, 自然状態の単為結果果実では空どう果の発生が見られない遺伝的単為結果系統 'Severianin' の単為結果果実の発達に及ぼす CPPU の影響について検討した.

第1節 オーキシン誘導単為結果トマトの空どう果発生と果実発達に CPPU が及ぼす影響

第1項 空どう果発生

1. 材料および方法

(実験1)

CPPU を開花時のオーキシン処理液に混用し、空どう果発生について調査した。1989 年 8 月 8 日に‘強力旭光’の種子を播種し、ガラス室内で湛液式養液栽培を行った。培養液の組成は $N:P:K=7.6:2.0:3.5 \text{ me l}^{-1}$ とし、液量が半量となった時点で水を加え $EC \ 1.2 \text{ mS cm}^{-1}$ となるように培養液を調製した。pH は $1N\text{-H}_2\text{SO}_4$ により 5.5~6.5 の範囲に維持した。培養液の循環は昼間 1 時間ごとに 15 分間、夜間 3 時間ごとに 15 分間行った。装置は $53\text{cm} \times 200\text{cm}$ の水耕用ベッドで、ベッドあたり 12 株の割合で栽植し、第 1 段花房上 2 葉を残して摘心した。各花房 2~5 番花の柱頭を開花前に切除し、開花時にオーキシン処理液としてクロキシホナック ((4-chloro-2-hydroxymethylphenoxy) acetate, HCPA) 300 mg l^{-1} 溶液を用い、0, 50, 100 mg l^{-1} のホルクロルフエニユロン (1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea, CPPU) を混合した区および受粉区を設けた。処理は 10 月 4 日から 10 月 26 日まで行い、各花への処理液の展着を確実にし他の部位への飛散を防止するために浸漬処理とした。処理後 30 日目に収穫し、果実の新鮮重および体積を測定した。空どう程度は赤道面で横断し目視で 6 段階にわけて判定し、1 (空どうなし) ~ 6 (甚だしい空どう果) の評点を与えた (第 1-1 図)。空どう程度 3 以上の果実を空どう果として空どう果発生率を算出した。

(実験2)

オーキシン濃度が高い場合の CPPU の空どう果発生抑制効果を明らかにする目的で、オーキシン濃度と CPPU 濃度を変えた場合の空どう果発生を検討し、各処理区の果実の形態的特徴を調査した。1990 年 8 月 19 日に‘強力旭光’の種子を播種し、

9月16日からガラス室内で実験1と同様に栽培した。処理は10月10日から11月13日に行い、HCPA 200, 500 mg l⁻¹ と CPPU 0, 50, 300 mg l⁻¹ の組み合わせとして各花開花時に浸漬処理した。処理後15日目、20日目および30日目に果実を採取し、果実重、体積、果実径、果梗部径、がく片の長さ、がく重を測定し、赤道面で横断して、実験1と同様に空どう程度を判定し、胎座部の厚み、果心径、果皮の厚みおよび隔壁の厚みを測定した(第1-2図)。

2. 結果および考察

(実験1)

HCPA 300mg l⁻¹ 単用区では、空どう果発生率が約70%、平均空どう程度が3.5であったのに対し、CPPU 50 mg l⁻¹ または100 mg l⁻¹ 混用区では、空どう果発生率はそれぞれ24%、4%に低下し、平均空どう程度は2.2、2.3であり、明らかに空どう果発生が抑制された(第1-1表、第1-3図)。CPPU 100mg l⁻¹ 混用区のほうが50mg l⁻¹ 混用区よりも空どう果発生率は高くなったが、空どう程度5以上の著しい空どう果の発生についてみると50mg l⁻¹ 混用区では13%であったのに対し100mg l⁻¹ 混用区では0%であった。果実重については受粉区を含めていずれの処理区についても有意差がなかった。

(実験2)

HCPA 単用では200mg l⁻¹, 500mg l⁻¹ 区ともに著しい空どう果が高率で発生した(第1-2表、第1-4図)。HCPA 200mg l⁻¹ 区ではそれにCPPUを50 mg l⁻¹ 混用すると空どう果発生率が低下し、空どう程度5以上の果実がほとんどなくなった。そのために平均空どう程度は受粉果(有種子果)とほぼ同程度となった。果実重はHCPA 単用区とほぼ同じで受粉区よりも大となる傾向が認められた。さらにCPPU 300mg l⁻¹ 混用区では果実重は大であったが、空どう程度5の果実が増え、平均空どう程度は3.0となった。HCPA 200mg l⁻¹ 単用区と比較して空どう程度6の果実数は減少し、平均空どう程度に有意な差が認められた。

HCPA 500mg l⁻¹区では CPPU 50mg l⁻¹混用区, 300mg l⁻¹ 混用区ともに空どう果発生率および平均空どう程度が低かった。また, CPPU 50mg l⁻¹ 混用区と 300mg l⁻¹ 混用区の比較では後者のほうが低くなった。

果実の形態的形質を第 1-3 表に示した。果実径は受粉区よりも HCPA 区で大きく, 果皮の厚み, 隔壁の厚みでは有意差がないが, 果心径については HCPA 処理果実で受粉果よりも小さくなる傾向が認められた。CPPU を混用すると果心, 果皮, 隔壁の厚みが増加し, 果実径は受粉果と同程度あるいはそれ以上の大きさになる傾向が認められた。また, CPPU の影響は果梗, がくに強くあらわれ, がく片の肥厚や花弁が緑色化して萎凋しない, あるいは果梗が異常に太くなることなどが観察され (第 1-5 図), がく片は長くなり, 果梗は 15 日目にすでに他の区に比べて著しく肥大し離層部分で受粉区の倍近くの太さになった (第 1-3 表)。CPPU 300mg l⁻¹ 混用区の果実重は, 開花後 15 日目では比較的小さいが (データ略), 30 日目では処理区中最大となっており, 果実発達の後期における肥大が著しいことを示している。CPPU 混用区では果梗の肥大, すなわち木部導管組織が良く発達していることが, 開花後 15 日目以降の果実肥大に関与している可能性が考えられる。

以上の実験結果から, CPPU をオーキシシンと混合して開花時に処理することで過剰なオーキシシンによる空どう果の発生を抑制できることが明らかとなった。実験 2 で HCPA 500mg l⁻¹ に混用した場合, CPPU の濃度が 50mg l⁻¹ よりも 300mg l⁻¹ で空どう程度 5 以上の果実が減少していることから, HCPA 500mg l⁻¹ という高いオーキシシン濃度の場合でも CPPU の濃度がそれに応じて高ければ空どう果の発生が抑制されるものと推察される。ただし, HCPA 200mg l⁻¹ 区で CPPU 300mg l⁻¹ 混用区 of 空どう果発生率が 50mg l⁻¹ 混用区よりも高くなったことから, HCPA 200mg l⁻¹ 処理に対する CPPU の適正処理濃度は 300 mg l⁻¹ 未満であると思われる。

CPU の果実重に及ぼす影響についてみると, 実験 1 では有意差がなく, 実験 2 では HCPA 200 mg l⁻¹ 単用区と CPU 混用区とで差がなかった。このことは, 通常の濃度範囲では果実重に影響を及ぼさないことを示唆している。

果実の形態観察の結果から、HCPA 処理果実では果心、果皮、隔壁などの厚みの減少と果実径の増加によって空どう果が生じており、CPPU の混用は、果心、果皮、隔壁の厚みを増加させ、空どう程度を減少させた。

本節の実験では CPPU の影響を明確にするためにかなり高い濃度のオーキシンを使用しており、実用的にはさらに低い濃度でも効果が期待できる。空どう果発生を抑制する手段としてジベレリン混用が行われているが、山崎ら（1961）はジベレリン処理はオーキシンの処理に先立って行う場合に有効であり、混用した場合の効果は十分ではなく、果実重がオーキシン単用に比べて小さくなる傾向があることを指摘している。CPPU 混用処理はオーキシンと同時の 1 回の処理で済み、果実重の減少を伴わずに空どう果発生が抑制され、使用濃度範囲は比較的広いことから実用性はきわめて高いと考えられる。

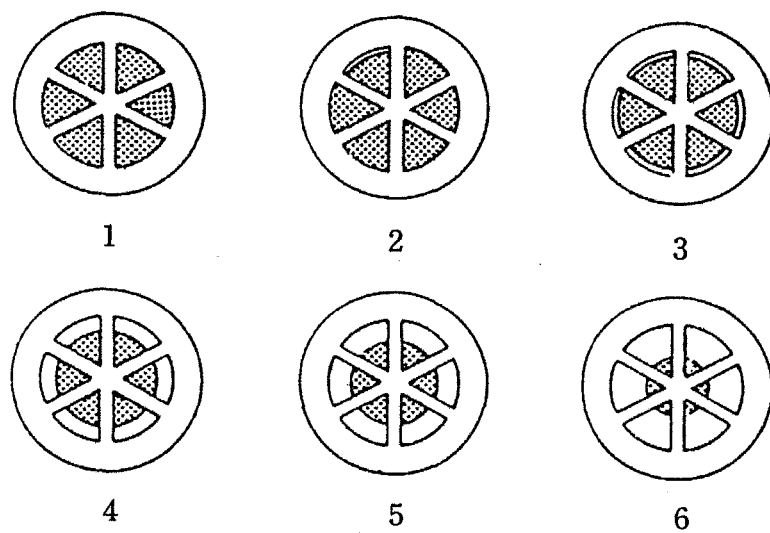


Fig. 1-1. Scale for judging the degree of puffiness of tomato fruits.

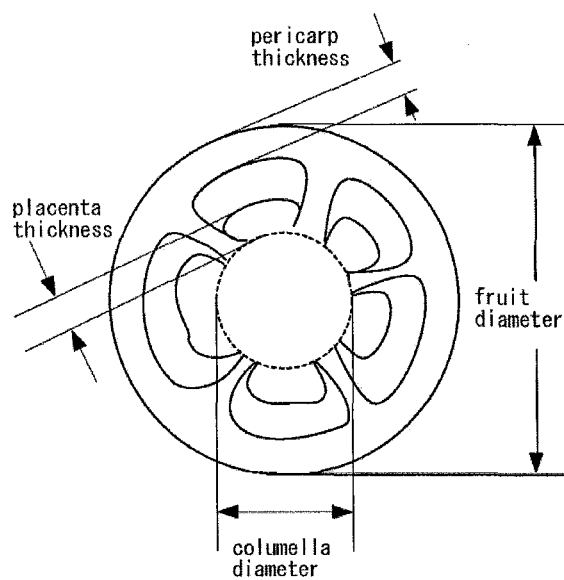


Fig. 1-2. Transverse section of tomato fruit.

Table 1-1. The degree of puffiness and fruit weight of tomato cv. Kyouryoku-kyokkou 30 days after treatment of cloxyfonac (HCPA) and forchlorfenuron (CPPU) at anthesis (1989).

	Degree of puffiness ^z	Fruit weight (g)
Pollinated	1.2 a ^y	110.6 a
HCPA 300 mg l ⁻¹	3.5 c	114.1 a
HCPA 300mg l ⁻¹ + CPPU 50mg l ⁻¹	2.2 b	113.2 a
HCPA 300mg l ⁻¹ + CPPU 100mg l ⁻¹	2.3 b	119.4 a

^z Judged visually based on the scale from none (score 1) to severe (score 6).

^y Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

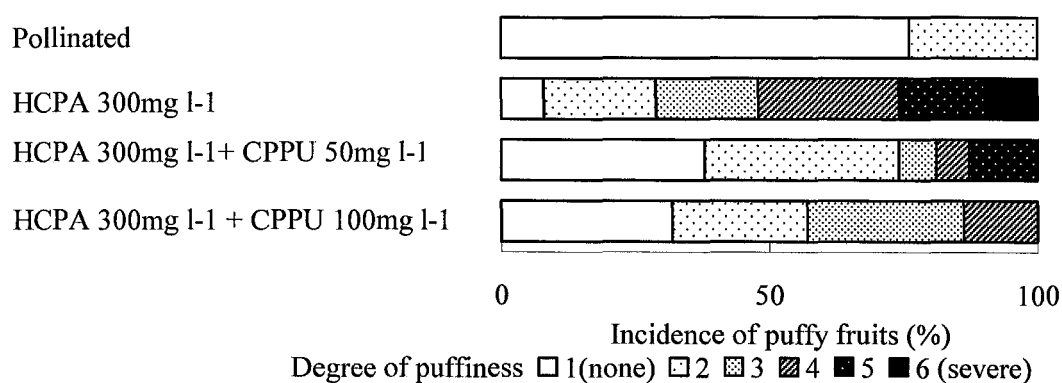


Fig. 1-3. The incidence of puffy fruits of tomato cv. Kyouryouku-kyokkou 30 days after treatment of cloxyfonac (HCPA) and forchlorfenuron (CPPU) at anthesis (1989).

Table 1-2. The incidence and the degree of puffiness of tomato cv. Kyouryoku-kyokkou treated with cloxyfonac (HCPA) and forchlorfenuron (CPPU) at anthesis (1990).

	Incidence of puffiness (%)	Degree of puffiness ^z
Pollinated	0.0	1.3 a ^y
HCPA 200 mg l ⁻¹	77.8	3.9 cd
HCPA 200 mg l ⁻¹ + CPPU 50 mg l ⁻¹	9.5	1.6 a
HCPA 200 mg l ⁻¹ + CPPU 300 mg l ⁻¹	60.0	3.0 b
HCPA 500 mg l ⁻¹	86.4	4.4 d
HCPA 500 mg l ⁻¹ + CPPU 50 mg l ⁻¹	59.1	3.2 bc
HCPA 500 mg l ⁻¹ + CPPU 300 mg l ⁻¹	52.9	2.6 b

^z Judged visually based on the scale from none (score 1) to severe (score 6).

^y Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

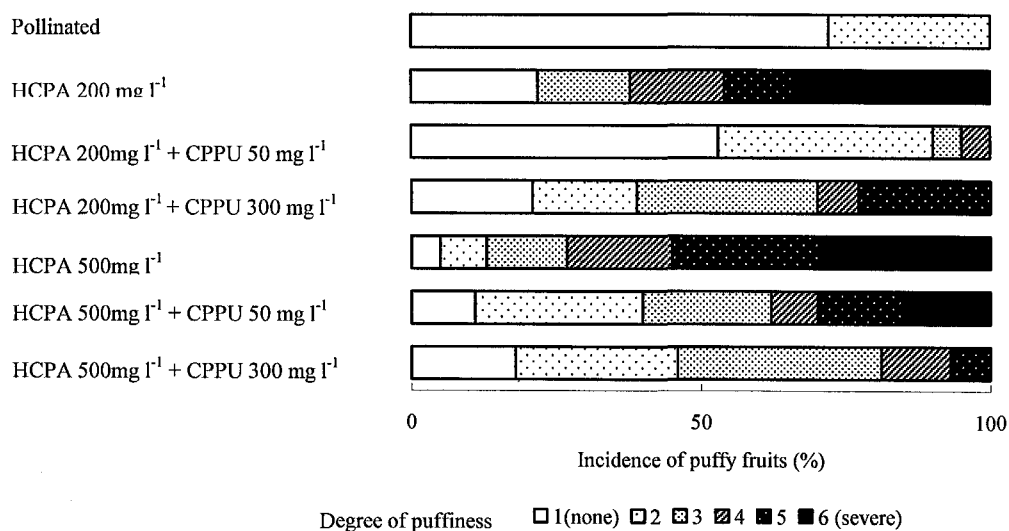


Fig. 1-4. The incidence of the puffy fruits of tomato cv. 'Kyouryoku-kyokkou' 30 days after treatment of cloxyfonac (HCPA) and forchlorfenuron (CPPU) at anthesis (1990)

Table 1-3. Characters of tomato fruit cv Kyouryoku-kyokkou treated with cloxyfonac (HCPA) and forchlorefenuron (CPPU) (1990, autumn).

Days after anthesis	Fruit weight		Specific gravity		Fruit diameter		Peduncle diameter		Calyx length	
	30		30		15	30	15	30	15	30
	g				mm		mm		mm	
Pollinated	92.1	b ^z	0.95	a	32	ab	5.4	c	36	b
HCPA 200mg l ⁻¹	98.1	ab	0.85	bc	28	b	5.6	c	42	a
HCPA 200mg l ⁻¹ + CPPU 50 mg l ⁻¹	99.2	ab	0.95	a	36	a	7.0	b	43	a
HCPA 200mg l ⁻¹ + CPPU 300mg l ⁻¹	120.4	a	0.88	bc	32	ab	8.9	a	43	a
HCPA 500mg l ⁻¹	117.4	ab	0.84	c	35	a	6.4	bcd	40	ab
HCPA 500mg l ⁻¹ + CPPU 50mg l ⁻¹	92.9	b	0.87	bc	35	a	7.0	bc	44	a
HCPA 500mg l ⁻¹ + CPPU 300mg l ⁻¹	114.5	ab	0.89	b	32	ab	8.6	ab	40	ab

Days after anthesis	Pericarp thickness		Placenta thickness		Columella diameter		Septum thickness	
	15	30	15	30	15	30	15	30
	mm		mm		mm		mm	
Pollinated	2.3	abc	4.5	c	1.5	ab	2.6	ab
HCPA 200mg l ⁻¹	2.0	c	4.6	c	1.4	ab	2.4	b
HCPA 200mg l ⁻¹ + CPPU 50 mg l ⁻¹	2.8	a	4.9	bc	1.6	ab	2.6	ab
HCPA 200mg l ⁻¹ + CPPU 300mg l ⁻¹	2.2	bc	5.5	a	1.5	ab	2.7	a
HCPA 500mg l ⁻¹	2.6	ab	4.5	c	1.6	a	2.5	ab
HCPA 500mg l ⁻¹ + CPPU 50mg l ⁻¹	2.5	abc	4.9	bc	1.5	ab	2.4	b
HCPA 500mg l ⁻¹ + CPPU 300mg l ⁻¹	2.8	a	5.3	ab	1.4	b	2.6	ab

^z Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.



Fig. 1-5. Tomato fruits, 10 days after treatment with cloxyfonac (200 mg l^{-1}) and forchlorfenuron (50 mg l^{-1}) at anthesis, showing green petals and enlarged calyces and peduncles.

第2項 果実の発達と組織形態

第1項で述べたように、CPPUの開花時処理によって、過剰なオーキシン処理に起因する空どう果発生が抑制される。この際、果こう及びがく片の顕著な生長が観察された。本項においては、この作用性について詳細にすることを目的に、オーキシン誘導単為結果果実、CPPU混用オーキシン処理果実、CCC混用オーキシン処理果実および受粉果について、果実重、果実径およびがく重の増加を測定し、同時に組織切片を作成して細胞肥大の様相の違いを光学顕微鏡下で観察した。

1. 材料及び方法

1990年8月14日にトマト‘強力旭光’の種子を播種し、ポリポットで育苗後、9月30日にビニルハウス内の地床に30cm間隔で定植した。第2段果房の上2葉を残して摘心した。第1段花房第1花を除去し、全花を開花前に除雄し、各処理日に開花している花を各花房2花選び、処理を行った。処理は、HCPA 300mg l⁻¹水溶液(処理日10月14日)、HCPA 300mg l⁻¹とCPPU 50mg l⁻¹の混合液(処理日10月15日、16日)、HCPA 300mg l⁻¹とCCC ((2-chloro-ethyl) trimethylammonium chloride) 1000mg l⁻¹の混合液(処理日10月18日～21日)に花房を浸漬する3区と、対照区として人工受粉区(開花日10月26日、28日)を設定した。処理液には展着剤としてそれぞれTween80を0.05%加えた。

開花後3、5、10、20および30日目に果実を収穫し、各区10～12個について、果実重、果実径、がく重(離層部までの果こうを含む)を測定した。平均的な果実を各区2個選び、FAA(エタノール12:蒸留水6:ホルマリン1:氷酢酸1, v/v)で固定・保存した後、Technovit® 7100樹脂で包埋して厚さ5μmの切片を作り、trouidin blue Oで染色して、光学顕微鏡下で子房壁、隔壁の細胞層数および細胞径を測定し、組織ごとの細胞肥大の様相の違いの観察を行った。

2. 結果

開花後10日目以降、CCC+HCPA区の果実肥大が他の区に比べて劣っていたが、ほかの3区は、果実重および果実径についてほぼ同様な増加を示した。CPPU

処理によってがくが顕著に発達することを第 1 項で明らかにしたが、本実験において、果こう部を含むがく重として測定した結果、他の区との差異がいつそう明らかであり、処理 3 日目にはすでに他の区よりも大きい傾向があり、30 日目にはほかの区の約 3 倍以上の重さになり有意な差が認められた(第 1-4 表)。

切片の組織的観察については、観察点数が少なかったため、統計的な比較を行わなかったが、子房壁および隔壁ともに HCPA 単独処理区や受粉区で細胞層数の増加が処理後 10 日目にはとまっているのに対して、CPPU を加えた区では処理後 20 日目まで続いているように思われた。また、処理後 5 日目の隔壁細胞層数が他の区よりも多い傾向が認められた(第 1-5 表)。

第 1 項の結果と同様、開花時のオーキシン処理への CPPU 混合が果実肥大を抑制することはなかった。また、組織観察から子房壁および隔壁の細胞分裂が処理直後に CPPU 処理区で促進されている傾向が認められたが、細胞の大きさはむしろ小さく、CPPU 処理の空どう果発生抑制効果が細胞分裂の促進と過剰オーキシンによる細胞の肥大を抑制することによるものである可能性が示唆された。

Table 1-4 . Change of fruit fresh weight of 'Kyoryoku-kyokko' tomato treated with HCPA 300 mg l⁻¹, CPPU 50 mg l⁻¹ with HCPA 300 mg l⁻¹, and CCC 1000 mg l⁻¹ with HCPA 300 mg l⁻¹, and hand pollinated.

	Days after treatment				
	3	5	10	20	30
Fruit fresh weight (g)					
HCPA 300	0.016 a ^z	0.028 b	0.298 bc	9.31 a	35.1 a
CPPU 50 + HCPA 300	0.015 a	0.028 b	0.403 ab	8.70 a	34.1 a
CCC 1000 + HCPA 300	0.021 a	0.047 a	0.123 c	2.62 b	21.2 b
Pollinated	0.016 a	0.019 b	0.629 a	9.65 a	--
Fruit diameter (mm)					
HCPA 300	3.3 a	3.9 b	8.6 b	28.9 a	47.2 a
CPPU 50 + HCPA 300	3.2 a	4.0 b	9.7 ab	28.5 a	46.5 a
CCC 1000 + HCPA 300	3.7 a	4.6 a	6.0 c	16.3 b	38.0 b
Pollinated	3.3 a	3.5 b	10.8 a	28.3 a	--
Calyx fresh weight (g)					
HCPA 300	0.07 a	0.10 ab	0.22 c	0.48 b	0.51 b
CPPU 50 + HCPA 300	0.08 a	0.13 a	0.47 a	1.26 a	1.57 a
CCC 1000 + HCPA 300	0.70 a	0.11 ab	0.13 d	0.29 c	0.50 b
Pollinated	0.06 a	0.07 b	0.29 b	0.60 b	--

^z Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 1-5 . Change of cell layer number and cell diameter of pericarp and septum of 'Kyoryoku-kyokko' tomato treated with HCPA 300 mg l⁻¹, CPPU 50 mg l⁻¹ with HCPA 300 mg l⁻¹, and CCC 1000 mg l⁻¹ with HCPA 300 mg l⁻¹, and hand pollinated.

	Days after treatment			
	5	10	20	30
Cell layer number of pericarp				
HCPA 300	15.5	20.0	21.7	21.7
CPPU 50 + HCPA 300	18.5	17.0	23.3	22.5
CCC 1000 + HCPA 300	15.7	22.0	18.8	19.5
Pollinated	13.5	18.7	21.0	-- ^z
Cell diameter of pericarp(μm)				
HCPA 300	19.0	30.7	160.0	215.0
CPPU 50 + HCPA 300	20.0	22.7	147.5	225.0
CCC 1000 + HCPA 300	19.0	33.7	100.0	215.0
Pollinated	18.3	33.7	156.3	--
Cell layer number of septum				
HCPA 300	12.8	20.2	21.0	25.0
CPPU 50 + HCPA 300	16.8	15.2	20.0	20.0
CCC 1000 + HCPA 300	13.2	20.5	17.0	21.0
Pollinated	14.0	20.3	18.3	--
Cell diameter of septum(μm)				
HCPA 300	13.3	31.7	226.7	325.0
CPPU 50 + HCPA 300	18.7	24.0	166.3	262.5
CCC 1000 + HCPA 300	18.3	35.3	143.8	277.5
Pollinated	14.7	45.7	193.3	--

^zNo data.

第2節 単為結果性品種 ‘Severianin’ の果実発達に及ぼす CPPU および外生オーキシンの影響

前節において、CPPU の開花時処理によって空どう果発生が抑制されることを明らかにした。その際、果こう及びがく片の顕著な生長及び果心部の肥大が観察され、組織切片を作成したところ、CPPU 処理が果肉の細胞分裂を促進している可能性が示唆された。そこで、本節においては、この作用性について明らかにすることを目的に、合成オーキシンの代わりに単為結果する品種 ‘Severianin’ を供試して、CPPU の処理時期による果実発達への影響を検討した。‘Severianin’ は旧ソビエトの Gribovskaya Vegetable Breeding Station の N. Soloviova によって育成された非常に強い遺伝的単為結果性を示す品種であり (Philouze and Maisonneuve, 1978a ; Lukyanenko, 1991), *L. esculentum* と *L. hirsutum* の種間雑種に由来する (Lukyanenko, 1991)。雄性配偶子および雌性配偶子ともに正常であり、受粉すれば真正種子をもった果実をつける (Lin et al., 1983)。‘Severianin’ における単為結果性は劣性遺伝子 *pat-2* によるものであり、受粉しない場合には単為結果し、その果実は受粉した有種子果実とほぼ同様に正常に生長肥大し、空どう果の発生は見られない (Philouze and Maisonneuve, 1978a ; Philouze and Maisonneuve, 1978b)。 *pat-2* による単為結果性は高温条件下でも (Lin et al., 1982)、低温条件下でも (Vardy et al., 1989) 非常に安定しており、随伴する劣悪な形質もないことから、優れた育種素材として注目されている (菅原ら, 1990)。以下の実験では、野菜試験場盛岡支場育種第一研究室上村昭二室長より譲渡された種子を自殖によって維持してきた種子を用いた。

第1項では、開花3日前、開花当日、開花後3日目、開花後10日目にCPPU処理を行い、処理の時期が赤熟時の果実重に及ぼす影響を検討するとともに、組織切片を経時的に観察して子房壁および隔壁部の果皮細胞の分裂・肥大を比較した。第2項では、この ‘Severianin’ に合成オーキシンの処理して強制的に空どう果が発生する状況を作り、その上で、CPPU 処理が空どう果発生と果実肥大に及ぼす影響を、開花前処理と開花後処理に分けて検討した。

第1項 処理時期による影響の違い

1. 材料及び方法

トマト ‘Severianon’ は1990年3月12日に播種し、ポリポットで育苗後、5月9日にビニールハウス内の地床に30cm間隔で定植した。第2段果房の上2葉を残して摘心した。第1段花房第1花を除去し、全花を開花前に除雄し、各処理日に開花している花を各花房2花選び、処理を行った。処理は、CPPU 50mg l⁻¹を開花3日前、開花当日、開花後3日目および開花後10日目にそれぞれ花房浸漬し、対照として除雄後放置区を設定した。

赤熟時に果実を収穫し、各区 8~18 個について、果実重、果実径、がく重（離層部までの果こうを含む）を測定した。また、処理後 3, 5 および 10 日目に平均的な果実を各区 2 個選び、FAA（エタノール 12：蒸留水 6：ホルマリン 1：氷酢酸 1, v/v）で固定・保存した後、Technovit 7100®樹脂で包埋して 5 μ m の切片を作り、trouidin blue O で染色して、子房壁、隔壁および果梗横断面の細胞層数および細胞径を測定した。果梗部は髄、木部、皮層にわけて測定した。

2. 結果および考察

CPU は開花後に処理した場合、果実重、果実径、およびがく重を増加させ、成熟日数を短くする傾向が認められ、特に開花後 3 日目に処理した場合にもっとも影響が大きかった（第 1-6 表）。開花当日および開花 3 日前処理ではむしろ、果実肥大は抑制され成熟日数は長くなる傾向が認められた。

CPU の処理効果は前節と同様、がくと果梗部の肥厚に顕著に現れ、この効果は処理の時期に関わらず認められたが、特に開花後処理で顕著であった。無処理区と開花当日処理区の開花後 10 日目の果梗部の横断面顕微鏡写真を第 1-6 図に示した。皮層部の細胞が処理区で大きくなっており、皮層部の厚みが増しているのが観察された。開花後 10 日目の皮層の細胞径は対照区で約 65 μ m であったのに対して、当日処理区では約 120 μ m であった。皮層細胞の層数はいずれの区でも処理前後でほとんど変化がなく 10~14 で、CPU は、皮層では主として細胞肥大の促進として働いていた。髄の細胞層数については処理の影響は認められなかった。木部細胞は無処理区で

開花前 3 日に約 9 層だったのが開花後 10 日目では約 13 層になり，開花前後でわずかに増加すると思われた．一方，CPPU 処理区では 3 日前処理区の処理後 10 日目で約 17 層，当日処理区の処理後 10 日目で 20 層，3 日後処理区の処理後 10 日目で約 25 層，10 日後処理区の処理後 10 日目で 18 層となり，細胞分裂が促進されていることが示唆された．木部細胞の細胞径に処理区の差はなかった．子房壁および隔壁の細胞発達に対する CPPU 処理の影響は明らかではなかった．

Table 1-6. Fruit fresh weight, fruit diameter, calyx weight and days to mature of 'Severianin' tomato treated with CPPU 50 mg l⁻¹ at 3 days before anthesis, at anthesis, 3 and 10 days after anthesis, and control. Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

CPPU 50 mg liter ⁻¹ treatment	Fruit weight (g)	Fruit diameter (mm)	Calyx weight (g)	Days to mature
3 days before anthesis	115.6 c ^z	67.7 b	1.5 b	47.7 a
At anthesis	115.7 c	64.1 b	1.4 b	47.4 a
3 days after anthesis	176.6 a	78.5 a	2.2 a	39.0 c
10 days after anthesis	163.0 ab	75.8 a	1.9 a	42.3 bc
Control	128.2 bc	70.2 ab	1.0 c	44.2 ab

^z Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

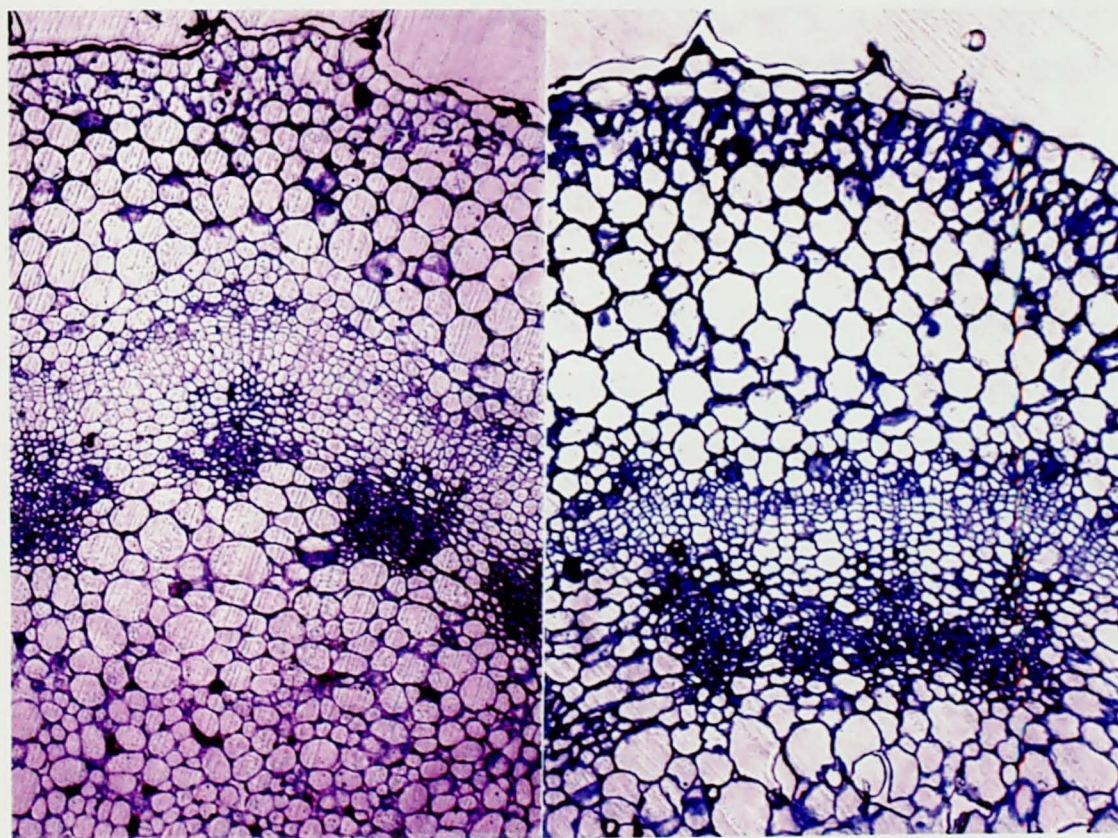


Fig. 1-6. Cross sections of peduncles of tomato 3 days after anthesis treated with CPPU 50mg l⁻¹ at anthesis (right) compared to a control (left) in 'Severianin'.

第2項 合成オーキシン処理と併用した場合の影響

1. 材料及び方法

1990年8月14日にトマト‘Severianin’の種子を播種し、育苗後、10月6日に18cmプラスチック鉢に定植して、ビニールハウス内で栽培した。第2段果房の上2葉を残して摘心した。第1段花房第1花を除去し、全花を開花前に除雄し、各処理日に開花している花を各花房2花選び、処理を行った。処理区は、開花3日前CPPU 50mg l⁻¹溶液に花房浸漬し、開花時にHCPA 300mg l⁻¹溶液に浸漬する区、開花時にHCPA 300mg l⁻¹溶液に浸漬し、開花3日後にCPPU 50mg l⁻¹溶液に花房浸漬する区、および対照区として開花時にHCPA 300mg l⁻¹溶液に浸漬する区の3区とした。調査は、開花後1, 2, 3, 4および6週間目と催色期に、各区10~12果を収穫し、果実重、果実径、および離層部までの果梗を含むがく重を測定した。催色期には果心半径、子房壁の厚み、隔壁の厚みを測定し、空どう程度を判定した。

2. 結果および考察

HCPAを開花時に処理することで単為結果系統‘Severianin’にも空どう果が発生した。この空どう果発生は開花前および開花後のCPPU 50mg l⁻¹浸漬処理によって抑制された(第1-7表)。*‘Severianin’*の*pat-2*遺伝子を導入して育成された単為結果性品種‘ルネッサンス’(菅原ら, 2002)の、果径6から8cmの果実の果皮におけるIAA濃度は、受粉果実とほぼ同等であり、特に隔壁部のシンプラストで高い(Kojima et al., 2003)。おそらく‘ルネッサンス’と同様に、‘Severianin’の単為結果果実においても、果実組織あるいは胎座組織において果実発達に十分なレベルの内生オーキシンが存在し、外生的に与えたオーキシンが過剰になったために空どう果が発生したと思われる、果実発達過程におけるサイトカイニンとオーキシンに対する生理的反応に関して、一般的な品種と大きな違いがないことが示唆された。

抑制効果は開花3日前処理のほうが高く、この処理によって果心部が有意に大きくなった。子房壁および隔壁に及ぼす影響は明らかではなかった。

果実重や果径は開花後3日目CPPU処理によって促進され、成熟時の果実は有意に大きくなった(第1-8表)。前節と同様、CPPU処理による顕著ながくおよび果梗

の肥大が観察され，特に，開花後 3 日目処理区で著しい肥大促進が認められた．開花後 1 週間目ですでに対照区との差は明らかであった．

Table 1-7. Effects of CPPU 50 mg l⁻¹ treatment at 3 days before and after anthesis on degree of puffiness, columella diameter, pericarp thickness and septum thickness of 'Severianin' tomato treated with HCPA 300 mg l⁻¹ at anthesis.

	Degree of puffiness ^z	Columella diameter (mm)	Pericarp thickness (mm)	Septum thickness (mm)
CPPU 3 DBA + HCPA	1.4 b ^y	12.4 a	6.2 a	7.9 a
CPPU 3 DAA + HCPA	2.0 b	10.1 b	6.5 a	8.1 a
HCPA	3.5 a	9.3 b	6.7 a	7.8 a

^z Degree of puffiness was judged visually from none (score 0) to severe (score 6).

^y Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 1-8. Effects of CPPU 50 mg l⁻¹ treatment at 3 days before and after anthesis on fruit fresh weight, fruit diameter and calyx weight of 'Severianin' tomato treated with HCPA 300 mg l⁻¹ at anthesis.

	1 WAA ^y	2 WAA	3 WAA	4 WAA	6 WAA	Mature
Fruit fresh weight(g)						
CPPU 3 DBA ^x + HCPA	0.2 b ^z	5.3 b	20.9 b	49.6 a	101.1 b	135.5 b
CPPU 3 DAA ^w + HCPA	0.5 a	7.0 a	30.3 a	55.9 a	129.8 a	150.0 a
HCPA	0.3 b	7.2 a	25.7 ab	53.7 a	105.8 b	126.1 b
Fruit diameter (mm)						
CPPU 3 DBA + HCPA	7.5 b	23.7 b	37.5 b	50.5 a	63.9 b	69.5 ab
CPPU 3 DAA + HCPA	10.7 a	26.0 a	42.0 a	52.7 a	69.5 a	72.1 a
HCPA	8.7 b	26.6 a	40.9 a	52.2 a	63.7 b	68.8 b
Calyx weight (g)						
CPPU 3 DBA + HCPA	0.33 a	0.70 b	0.76 b	0.80 b	0.98 a	0.86 b
CPPU 3 DAA + HCPA	0.40 a	0.97 a	0.90 a	1.21 a	1.11 a	1.16 a
HCPA	0.24 b	0.55 c	0.58 c	0.58 c	0.62 b	0.66 b

^z Different letters significantly different at P=0.05 by Duncan's multiple range test.

^y Weeks after anthesis.

^x Days before anthesis.

^w Days after anthesis.

第3節 総合考察

以上の実験結果から、CPPU をオーキシシンと混合して開花時に処理することで過剰なオーキシシンによる空どう果の発生を抑制できることが明らかとなった。第1節では実験的にかなり高いオーキシシン濃度で処理を行ったが、それに応じた高い濃度のCPPU を混用すれば空どう果の発生が抑制された。CPPU 混用処理はオーキシシンと同時の1回の処理で済み、果実重の減少を伴わずに空どう果発生が抑制され、使用濃度範囲は比較的広いことから実用性はきわめて高いと考えられる。

果実の形態観察から HCPA 処理果実では果心、果皮、隔壁などの厚みの減少と果実径の増加によって空どう果が生じていると考えられた。CPPU を加えた区では、子房壁および隔壁の細胞分裂が処理直後に促進されている傾向が認められたが、細胞の大きさはむしろ小さく、CPPU 処理の空どう果発生抑制効果が細胞分裂の促進とオーキシシンによる細胞の過剰肥大を抑制することによるものである可能性が示唆された。

遺伝的に単為結果する品種、‘Severianin’では通常空どう果発生は見られないが、合成オーキシシン処理によって、一般品種と同様に空どう果が発生した。また、この空どう果発生は‘強力旭光’の場合と同様、CPPU によって抑制された。

CPU の作用の様相は‘Severianin’でも‘強力旭光’の場合と同様であったが、開花当日および開花3日前処理では果実肥大が抑制され、成熟日数は長くなる傾向が認められたのに対して、開花後3日目に処理すると肥大に促進的に働いた。このことは、開花をはさんだ前後で子房の生理的状态が変化していることを反映していると思われる、子房の細胞分裂期間や他の内生植物生長物質の変動などに関連しているのではないかと考えられる。トマト果皮の細胞分裂は開花後から1週間後の間で最も盛んであり、それ以降の果実肥大は主に細胞の肥大によるものとされる (Asahira et al., 1968 ; Mapelli et al., 1978)。内生サイトカイニン濃度は開花直後にもっとも高く、それ以降漸減すること (Bohner and Bangerth, 1988 ; Abdel-Rahman et al., 1975 ; Gillaspie et al., 1993) から、内生サイトカイニンレベルが低下しつつある開花後3日目に、CPPU を与えることで果皮の細胞分裂期間を延長した可能性がある

と思われた。

空どう果の発生は、相対的に過剰となったオーキシンにより、子房壁細胞が異常肥大したことによると考えられている。CPPU は開花前から開花時に使用することによって相対的なオーキシン濃度を低下させて、細胞の発達を正常化しているものと思われた。また、一方で、開花後に処理すると空どう果の発生抑制効果は小さくなったが、果実重は増加した。このことは空どう果発生にオーキシン/サイトカイニン比が関与している時期が、開花前から開花直後にかけての子房肥大のごく初期であることを示唆すると同時に、果実肥大後期における高いサイトカイニン活性が肥大に促進的に働くことを示唆している。CPPU 処理はブドウ（工藤・藤根，1987）、キウイフルーツ（田中，1987；小原ら，1991）などで果実肥大を顕著に促進し、また、スイカでは、果実の細胞数を増加させると同時に果梗中の導管数を増加させる（加納，1992）。

本実験の CPPU 混用区ではがくが肥厚し果梗が異常に太くなることが、特徴的な影響として、いずれの実験においても観察された。皮層部の細胞が処理区で大きくなっており、皮層部の厚みが増しているのが観察されたが、皮層細胞の層数はいずれの区でも処理前後でほとんど変化がなく 10~14 で、CPPU 処理は、皮層では主として細胞肥大を促進した。一方、木部の細胞は細胞径に処理区の差はなかったが、CPPU 処理によって、層数が顕著に増加しており、細胞分裂が促進されていることが示唆された。維管束組織の分化は、オーキシンの茎頂から根端に向けての極性移動が重要な要因であると考えられている（福田，1990）が、*in vitro*での柔細胞から管状要素（導管の構成細胞）への細胞分化にオーキシンとサイトカイニンの両ホルモンが必要であることが、ヒヤクニチソウの葉から単離した単細胞に関して報告されており（Fukuda，1997）、維管束組織の誘導・発達にオーキシンと同様、サイトカイニンが関わっていることを示唆している。

CPU による空どう果の発生抑制の一部は、果心部の顕著な肥大によると思われた。この果心部の肥大は、果梗部分の肥大、がく片の伸長など同質の反応であると思われるが、果梗の肥大は皮層細胞の肥大および木部細胞の分裂の促進によることが組織観察から明らかとなった。CPPU 300mg l⁻¹ 混用区の果実重は、開花後 15 日目

では比較的小さいが（データ略），30 日目では処理区中最大となっており，果実発達の後期における肥大が著しいことを示している．CPPU 混用区での果梗の肥大，すなわち木部導管組織の良好な発達が，開花後 15 日目以降の果実肥大に関与している可能性が考えられる．トマト果実の通導組織は 2 系統に分岐しており，一方は果梗から果皮の外側を通り，他方は果梗内側から隔壁部を通り種子にいたっている（Ho and Hewitt, 1986）．果梗部の通導組織が良く発達していることが光合成産物の転流・分配や水分の流入の際，有利に働くことが推測される．

第4節 摘要

過剰のオーキシシン処理によって誘発されるトマトの空どう果発生を、サイトカイニン活性物質ホルクロルフエニユロン（1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea, CPPU）を 50~300mg l⁻¹ の濃度でオーキシシンに混用することで抑制できた。CPPU 混用区の果実はオーキシシン単用区の果実に比べて果実重が減少せず、果梗、がく片の肥大が顕著で、果心径の大きい果実となった。

CPPU および CCC のオーキシシン処理溶液への混用が合成オーキシシン誘導単為結果の果実発達に及ぼす影響について検討した。CCC は果実肥大を抑制したが、CPPU の混用は果実重に影響がなかった。組織切片の観察から CPPU の混用処理は、細胞分裂を促進し、過剰なオーキシシンによる細胞肥大を抑制することによって空どう果発生を抑制していることが示唆された。また、CPPU 処理果実では、果梗部を含むがく重が顕著に大きくなった。

遺伝的単為結果トマト品種 ‘Severianin’ を供試して、合成オーキシシンを使わずに単為結果させた果実の発達への CPPU 処理の影響を、開花前 3 日、開花当日、開花後 3 日目および開花後 10 日目に CPPU 50 mg l⁻¹ 溶液に浸漬した果実についての、果実重、果実径、がく重、成熟日数の測定および果梗部の横断切片の観察から検討した。開花後の CPPU 処理は果実重、果実径およびがく重を増加させ、成熟日数を短縮する傾向が認められた。開花当日および開花 3 日前処理は、果実肥大を抑制し、成熟日数は長くなった。CPPU による果梗部の肥厚は、皮層部細胞の肥大促進と木部細胞の分裂促進によることが明らかとなった。

‘Severianin’ を供試し、除雄後開花時に合成オーキシシン HCPA 300mg l⁻¹ を浸漬処理した果実に CPPU 50 mg l⁻¹ 溶液を開花前 3 日、開花当日、開花後 3 日目に処理した時の果実発達について検討した。開花時の HCPA 処理によって本来発生しない空どう果が発生した。この空どう果発生は CPPU 処理によって抑制された。CPPU による果実肥大および果梗部肥大の効果は HCPA 処理と併用した本実験でも認められ、特に開花後 3 日目処理で著しい効果が認められた。

第2章 トマト果実の肥大と偽胚発達におけるジベレリンの役割

トマトでは、合成オーキシンを開花した花に処理することで単為結果果実発育を誘導し、有種子果と同等またはそれ以上の大きさの果実を生産することができる (Bünger-Kibler, 1982/1983). この技術はトマト果実生産の安定化に非常に貢献している. しかし、温度や、日照、合成オーキシンの濃度、植物体の状態などの要因によって空どう果を誘発することがある (山崎ら, 1961). このオーキシン誘導単為結果における空どう果の発生は、ジベレリンをあらかじめ処理しておくか (山崎ら, 1961), サイトカイニン活性を持つ化合物ホルクロルフェニユロン (1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea) をオーキシンの混用することで (片岡ら, 1994) 抑制される. 一方、遺伝的単為結果性トマト品種, ‘Severianin’ は、高温または低温といった受精に不適当な条件下で、受粉せずに心室が詰まった正常な果実を生産する. くわえて、人工授粉によって十分な数の発芽可能な種子をもった有種子果をつけることもできる. ‘Severianin’ の単為結果性は劣性遺伝子 *pat-2* によって制御されている (Philouze, 1978). この単為結果果実は有種子果と同じくらいの重さで、心室は完全に満たされる (Philouze and Maisonneuve, 1978b). すなわち、合成オーキシン、遺伝的単為結果、および受精という異なる手段による完全な果実を得ることができ、これらの比較によって果実発達の制御についてさらに明らかになることが期待される.

Koshioka et al.(1994)は、オーキシン誘導単為結果果実と有種子果の内生ジベレリンを比較し、GA₁₉ の活性がどちらの果実においても開花数日に増加し、開花後 10～14 日の GA₁ の濃度が単為結果のほうが有種子果よりも高いことを明らかにして、GA₁ の高いレベルが単為結果果実の大きい果実重と関連していることを示唆した. Mapelli et al.(1978)は、開花後 4 日目、正常果実ではジベレリンレベルがごく低いものに対して、単為結果変異系統(*sha/pat*)の果実ではジベレリン活性のピークがあることを明らかにした. Fos et al.(2000)は、ent-kauren oxidase 阻害剤であるパクロブトラゾールによって *pat-2* 誘導単為結果果実の着果と果実発育が阻害され、この阻害作用が同時に与えた GA₃ によって無効化されることを明らかにした. 彼らは *pat-2*

は、GA₁₂から、脱炭酸を伴う 20 位の 3 段階の酸化反応を連続的に行って GA₂₀ を生成する酵素である GA 20 位酸化酵素（山口，2003）の活性を高めて、活性 GA の前駆体である GA₂₀ を集積し、その結果として活性 GA である GA₁ の合成が高められ、それによって単為結果が誘導されていると結論している。

pat-2 の単為結果性がジベレリンの高い合成能によるものであること、かつ、‘Severianin’ では空どう果の発生がみられないことと、合成オーキシン誘導単為結果においてジベレリン前処理が空どう果の発生を抑制することは、果実着果から果実発達初期にジベレリンが果実発達の制御に果たしている役割を示唆すると考えられる。

本章においては、パクロブトラゾールと同様な作用性を持つジベレリン生合成阻害剤 ウニコナゾール ((E)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2(1,2,4-triazol-1-yl)-1penten-3-ol, Izumi et al., 1985) によって内生ジベレリンレベルを制御し、それに引き続いて、さまざまな果実発育段階にジベレリンを与えて、着果と果実発育段階におけるジベレリンの役割を検討した。

第 1 節 ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールが ‘Severianin’ の内生ジベレリンおよび果実肥大に及ぼす影響

1. 材料および方法

(ジベレリンの抽出と精製)

果実を 80% 冷メタノール中でホモジナイズし、3 回抽出した。ろ過後、メタノールを 42°C、減圧下で留去し、HCl で pH2.5 に調節し、酢酸エチルで分配した。酢酸エチル層を 0.2 %NaHCO₃ 溶液で抽出し、pH2.5 に調製し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層は乾固した後、0.1M リン酸バッファー (pH 8.0) に溶かし、ポリビニルピロリドンカラムで精製した。カラムはカラムボリュームの 4 倍の 0.1M リン酸バッファー (pH8.0) で溶出した。溶出液は HCl で pH2.5 に調整した後、酢酸エチルに分配し、減圧下で乾固し、少量の 50%メタノール・アセトンに溶解して、SephadexLH-20 カラム (50%メタノール・アセトンで洗浄) に載せ、50%メタノー

ル・アセトンで溶出した。カラム容量の 0.5 から 1 の溶出量を集め、減圧下で乾固した。45%メタノール・水に溶解し、あらかじめ 45%メタノール・水で前処理した C₁₈SepPak カートリッジに通したのち、減圧下で乾固した後、少量の 0.1%酢酸 45%メタノール・水に溶解し、HPLC によって分画した。HPLC は Develosil ODS HPLC カラム (10mm i.d.×150 mm) を用い、0.1%酢酸を含む 45%から 100%のメタノールのリニアグラジエントまたはステップグラジエントで溶出した。流量は 2ml l⁻¹ で、2 分毎に分取した。それぞれのフラクションを減圧下で乾燥し、生物活性を矮性イネ短銀坊主検定点適法 (Murakami, 1968) で検出した。生物活性の認められたフラクションはメタノールに溶解し、エタノールジアゾメタンでメチル化した後、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセラミドでトリメチルシリル化した。誘導した試料はフルスキャンコンパインドガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) で分析した。

(植物材料)

遺伝的単為結果性品種 ‘Severianin’ の自家受粉によって得た種子を砂またはバーミキュライトの入ったトレーに播種し、同じような生長度合いをしめした苗を選んで供試した。

(実験 1) 開花から果実肥大初期の果実の内生ジベレリンの消長

1985 年秋に、砂を詰めた 1a/5000 ワグナーポットに植えて加温ガラス室内で栽培し、必要に応じて液肥を灌水した。手で受粉したグループと開花前に除雄したグループについて果実を開花後 1, 2 および 4 週間目に収穫し、内生ジベレリンを測定した。生物検定においてはイネ苗 1 本当たり、開花後 1 週間の果実では新鮮重 2g 相当、開花後 2 週間および 4 週間目の果実の新鮮重 10g 相当の試料を供した。高い活性を示した HPLC のフラクション No.15~17 と 21~22 を集め GC-MS で同定した。

(実験 2) 開花後 7 日目に与えたウニコナゾールの影響

1989 年 10 月 17 日から加温ビニールハウスで栽培した。10 月 30 日から 11 月 5 日に開花した花を手で人工授粉し、開花日を記録した。各花房 2 から 3 個に果実を制限した。開花後 7 日目に花房をウニコナゾール (スミセブン®, Agros, Co. Ltd., Japan) 30mg l⁻¹ 溶液に浸漬した。種子を含む果実を、処理当日 (開花後 7 日目), 3

日後、1, 2 および 4 週間後に収穫し、実験 1 と同様にジベレリン分析のために抽出・精製し、矮性イネ‘短銀坊主’による生物検定によって活性を測定した。生物活性試料は矮性稲苗のそれぞれにトマト果実新鮮重 1g 相当になるように与えた。

(実験 3) 単為結果果実の生長に及ぼすウニコナゾール処理時期の影響

1989 年の春に無加温ビニールハウスで栽培した。開花前に除雄し、4 月 11 日から 21 日の間に開花した花を選び、4 月 20 日 (W0)、4 月 27 日 (W1)、5 月 3 日 (W2) および 5 月 11 日 (W3) に、 30mg l^{-1} のウニコナゾール溶液に浸漬した。催色期に達した果実から収穫し、重量を測定した。

(実験 4) 単為結果果実の着果率と発達に及ぼす肥大初期のウニコナゾール処理の影響

1991 年 6 月 19 日にビニールハウスに植え、開花前に除雄し、7 月 6 日から 15 日に開花した花を、各植物体 2 または 3 個に制限した。開花後 0, 3, 5 および 10 日目に、5, 10, 50mg l^{-1} のウニコナゾールに浸漬した。開花後 2 週間目、肥大した果実、落下した果実、肥大しないまま着いている果実(停止)の数を数えた。肥大した果実は重さを測定し、赤道面で横断して、果皮の厚み、胎座の厚み、果心の直径および果実の直径を計った。

(実験 5) ジベレリンとウニコナゾールの果実生長制御における拮抗

1991 年 9 月 14 日からガラス温室内の養液栽培で栽培した。開花前に除雄し、10 月 23 から 31 日に開花した花を各植物体、第 1 花房の 2 から 3 個に制限した。花房は 5mg l^{-1} のウニコナゾールと 5 または 50mg l^{-1} のジベレリン A_3 (ナカライテスク) で次のように処理した。1) ウニコナゾールとジベレリンの混合液に開花時に花房浸漬。2) 開花時にウニコナゾール溶液に花房浸漬し、開花後 3 日目にジベレリン溶液に浸漬。3) 果房を開花後 3 日目にウニコナゾール溶液に浸漬した後、開花後 5 日目にジベレリン溶液に浸漬。4) 果房を開花 5 日目にウニコナゾール溶液に浸漬し、開花後 10 日目にジベレリン溶液に浸漬。5) 花房を除雄後ウニコナゾールでもジベレリンでも処理しなかった。果実は開花後 6 週間で収穫し、果実重を測定した。

2. 結果および考察

(実験 1)

第 2-1 図に ‘Severianin’ トマト果実の内生ジベレリンの生物活性クロマトグラムを示した。開花後 1 週間目、受粉果実ではジベレリン活性が認められなかったが、単為結果果実ではフラクション 21 にジベレリン活性が認められた。開花後 2 週間目ではフラクション 15~17 と 21 に受粉果実、単為結果果実ともに高い活性が認められた。これらのフラクションは GC-MS により、順に GA₂₀ と GA₁₉ であることが確認された。開花 4 週間後では有種子果実ではフラクション 15~16, 21~22 および 24~25 に高い活性が認められた。単為結果果実ではフラクション 16 と 21 に活性が認められた。

以上の結果は、Koshioka et al.(1994)や Fos et al.(2000)の結果とほぼ同様であり、早期 13 位水酸化経路 (GA₁₂ から GA₅₃, GA₄₄, GA₁₉, GA₂₀, GA₂₉ に変換される経路) が受粉果実、遺伝的単為結果果実、およびオーキシン誘導単為結果果実に共通して存在することを示している。また、種子由来のジベレリンは果実肥大に働くジベレリンとは異なる代謝系のジベレリンであり、果実肥大の後期に発現し、果実の初期肥大に影響を及ぼしてはいないであろうことが示唆された。

(実験 2)

GA₂₀ および GA₁₉ と思われる二つの活性ピークが、開花後 7 日目、ウニコナゾール処理日の果実からの抽出物の HPLC フラクションに検出された (0 DAT, 第 2-2 図)。ウニコナゾール処理後 3 日目 (3 DAT) では、活性は検出されなかった。処理後 1 から 4 週間目で、GA₁₉ と考えられるフラクション 19 に低い活性が認められた。無処理果実の内生ジベレリンの活性は測定しなかったが、先の実験や Fos et al. (2000) の報告から、開花 1 週間から 4 週間の間、GA₁₉ または GA₂₀ がかなりの量で有種子果実に含まれることが推測される。ウニコナゾール処理後 4 週間目の平均果実重は 70.8±9.5 g で、対照区 (127.1±7.0) の約 56%であった。すなわち、ジベレリン生合成阻害剤であるウニコナゾールを開花後 1 週間目の果実に浸漬処理すると、処理後数日から 3 週間目の間、内生ジベレリンレベルが通常レベルよりも低下し、この低下によって果実発育が抑制されることが示された。

(実験 3)

ウニコナゾール処理時に若い果実ほど、成熟時に小さくなった (第 2-3 図). 開花後 3 週間目の処理は最終的な果実重に影響しなかった. 開花から催色までの期間はウニコナゾール処理の時期に関わらず約 50 日であった.

トマト果実の肥大はシグモイドカーブを描き、成熟までの期間の約 40~50%にあたる時期が果実重増加がもっとも大きくなる時期で、このとき果実容積は最終的な容積の 1/3 以下である(Varga and Bruinsma, 1976). 本実験では開花後 3 週間目が相当すると推定される. 開花直後から 2 週間までの若い果実へのウニコナゾール処理は催色期の果実の大きさを小さくしたが、一方、開花後 3 週間目の処理は最終的な果実の大きさに影響を及ぼさなかった. このことは、果実肥大率が最大になる時期およびそれ以降の内生ジベレリンレベルは後期の果実生長に重要ではないことを意味している. 内生ジベレリン活性は開花後 2 週間に最大に達し、その後減少する (Gillaspy, 1993) ことから、内生ジベレリンは初期の果実発達に重要な役割を果たしていることが推測される.

(実験 4)

ウニコナゾール 5mg l^{-1} 処理では開花 0~3 日後の処理で肥大した果実のパーセントが低くなった (第 2-1 表). 開花当日処理では落果が 23.1%であったのに対して、開花 3 日目処理では落果せずに肥大の止まっている果実の比率が多くなった. 10mg l^{-1} 処理では開花当日処理で肥大した果実は約 70%で、約 13 %が落ちないものの肥大しない発育停止果実であった. 処理濃度 50mg l^{-1} では開花当日処理で肥大した果実は 20%であり、処理時期が遅いほど肥大果実率が高くなる傾向が認められた. 開花後 10 日目に処理した果実は処理濃度に関わらず、全て着果し、開花 2 週間後の果実重や直径について対照区と有意な差がなかった. 開花時に 5 または 50mg l^{-1} のウニコナゾールで処理した果実は着果率が低かったが肥大を続けた果実は対照区よりも有意に果実径が大きく、胎座の厚みは小さく、果心が大きくなった. 果皮の厚みは 5mg l^{-1} 開花後 3 日目処理、 10mg l^{-1} の開花当日および開花後 3 日目処理では対照区よりも有意に小さかった. 果心半径については、ごく小果になった 5mg l^{-1} 開花後 3 日処理を除いて、ウニコナゾール処理によって大きくなる傾向が認められた. このように、

果実初期に与えたウニコナゾールが果皮と胎座を薄くし、果心を太くする方向で働く傾向があることが示唆された。ウニコナゾールによる内生ジベレリンの減少が果皮の厚みの減少を誘起していることから果皮の肥大発達にジベレリンが関与していると考えられる。アラビドプシスの単為結果性変異 *fwf* およびジベレリン非感受性変異 *gai-1* を用いた実験で、アラビドプシスの中果皮細胞の垂層分裂と肥大にはジベレリンが必要であることが明らかになっている (Vivian-Smith et al., 2001)。また、トマトについては、ジベレリン、IAA (indole-3-acetic acid)、4 CPA (4-chlorophenoxy acetic acid) によって誘導された単為結果の組織学的な比較に基づいて、オーキシンが細胞分裂の重要な制限要因であるが、ジベレリンは細胞の大きさの増加に関与していると報告されている (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982/1983)。

1990 年に行った予備試験では、開花時の 50 mg l⁻¹ のウニコナゾール処理によって着果した果実はなかった。そのため、1991 年春に行った本実験では、ウニコナゾール濃度を 5, 10, 50 mg l⁻¹ とし、処理日を開花後 0, 3, 5, 10 日目とした。肥大した果実の割合はウニコナゾールの濃度が同じであるとき、処理時期が早いほど、小さくなったが、50 mg l⁻¹ の開花時処理でも約 20% の果実が肥大した。この二つの実験の結果の違いは、ウニコナゾールに対する感受性またはジベレリン生合成の活性に影響を及ぼす季節的あるいは環境的要因によるものであると思われる。しかしながら、開花時または開花数日後に与えたウニコナゾールが結実と果実生長を強く阻害することは明らかである。開花後 10 日目より遅く与えたウニコナゾールはほとんど影響がなかった。

(実験 5)

ウニコナゾール (5 mg l⁻¹) とジベレリン (GA₃, 5 または 50 mg l⁻¹) の混合液で開花時に処理した果実は開花後 6 週間目で対照とほぼ同じ大きさであった (第 2-4 図)。果実重において対照区と有意な差が認められたのは、開花後 3 日目にウニコナゾールで処理し、2 日後 (開花後 5 日目) に 5 mg l⁻¹ のジベレリンで処理した果実だけであった。Fos et al. (2000) は、GA 生合成系の *ent-kaurene oxidase* 阻害剤であるパクロトラゾール施与が *pat-2* 誘導単為結果トマトの着果と果実生長を阻害し、この阻害が同時に与えた GA₃ によって無効化することを報告している。本実験では、濃度

を2段階とした GA₃ (5 または 50 mg l⁻¹) をウニコナゾール(5 mg l⁻¹)処理後の異なる時期に与え、ある一定の期間におけるジベレリンの影響を検討した。ウニコナゾールを開花後3日目に与え、その2日後 GA₃を 5 mg l⁻¹与えたとき、果実重は対照区よりも有意に減少しており、それ以外の GA₃ との組み合わせ処理では、ほとんど対照区と同等に回復した。言い換えれば、開花時にウニコナゾール(5 mg l⁻¹)が施与された場合、引き続いての GA₃ 処理は 5 mg l⁻¹濃度で抑制効果に打ち勝つのに十分であるが、開花後3日目のウニコナゾール処理の場合、5 mg l⁻¹の GA₃では十分ではなく、さらに高い濃度が必要であった。すなわち、果実生長には、受粉果実でいえば果皮および胎座の細胞分裂期、および胚発達の初期（内珠皮の細胞分裂）にあたる開花後3日から5日（Gillaspy et al., 1993）の期間の高い内生ジベレリンレベルが必要であることを示している。

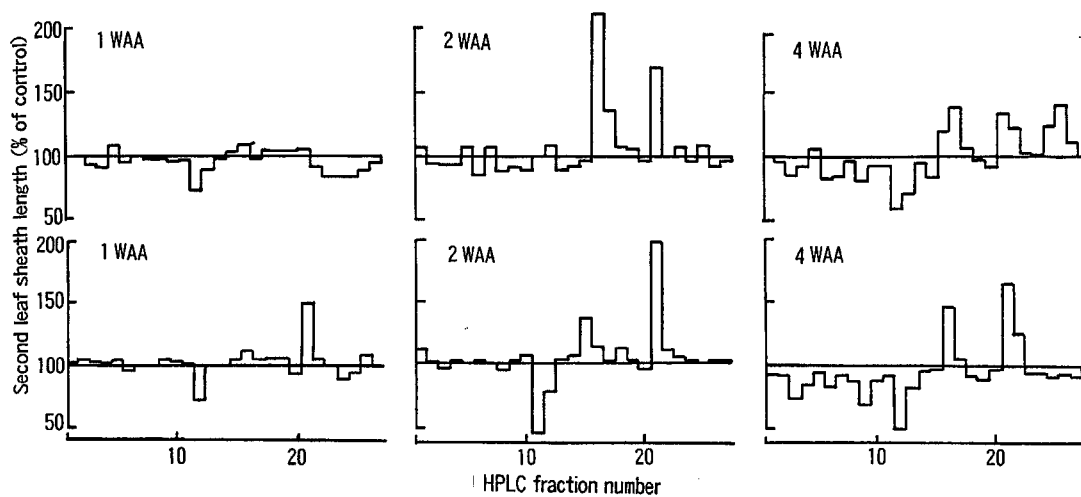


Fig.2-1. HPLC profile of the activity of gibberellins from parthenocarpic and seeded fruits in 'Severianin' tomato at 1, 2 and 4 weeks after anthesis. The activity of gibberellins is shown by the length of the second leaf sheath in the bioassay using a dwarf rice. Upper row: seeded fruits, lower row: parthenocarpic fruits, WAA: weeks after anthesis.

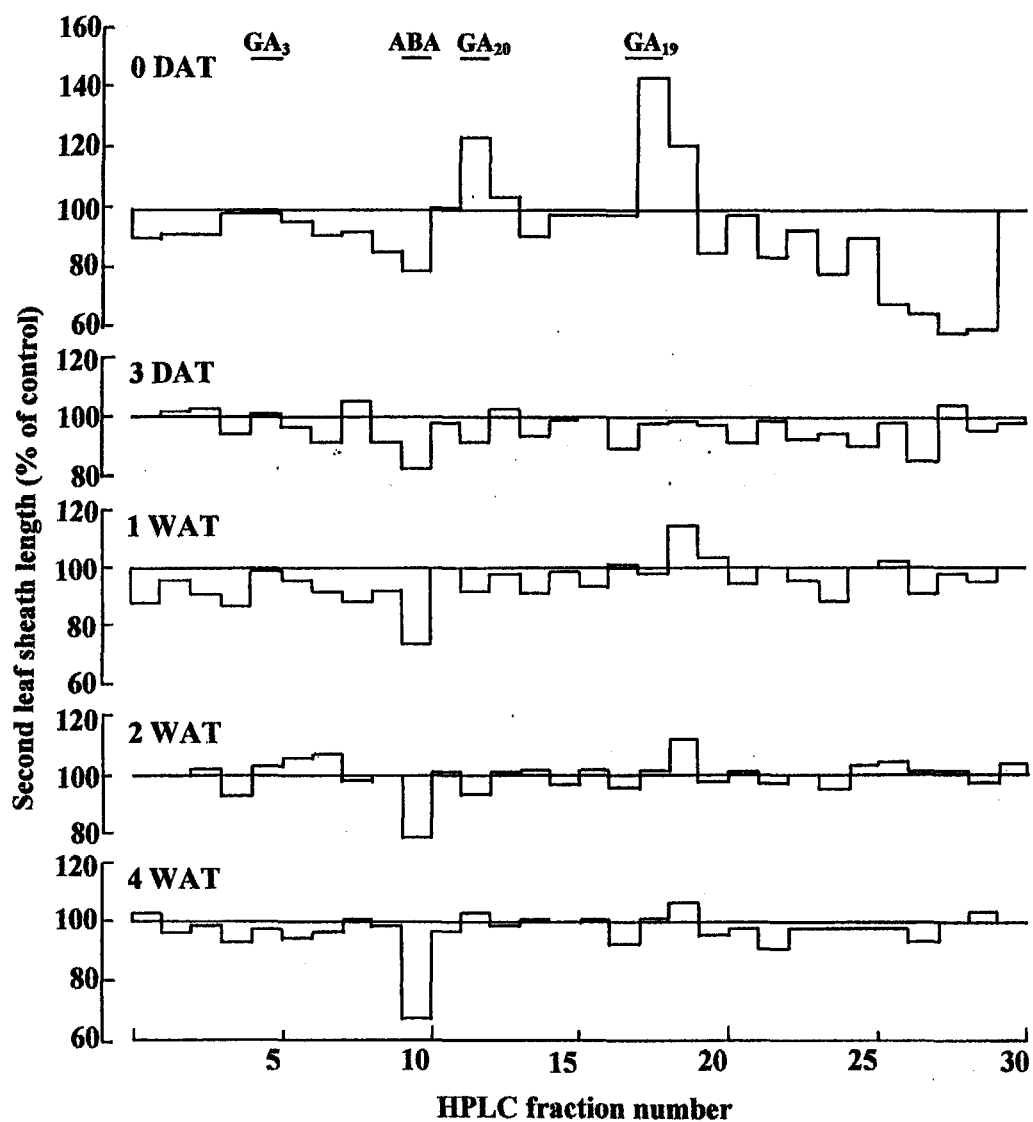


Fig.2-2. HPLC profile of the activity of gibberellins from the seeded fruits of 'Severianin' tomato after the treatment with uniconazole solution at 7 days after anthesis. DAT: days after treatment, WAT: weeks after treatment.

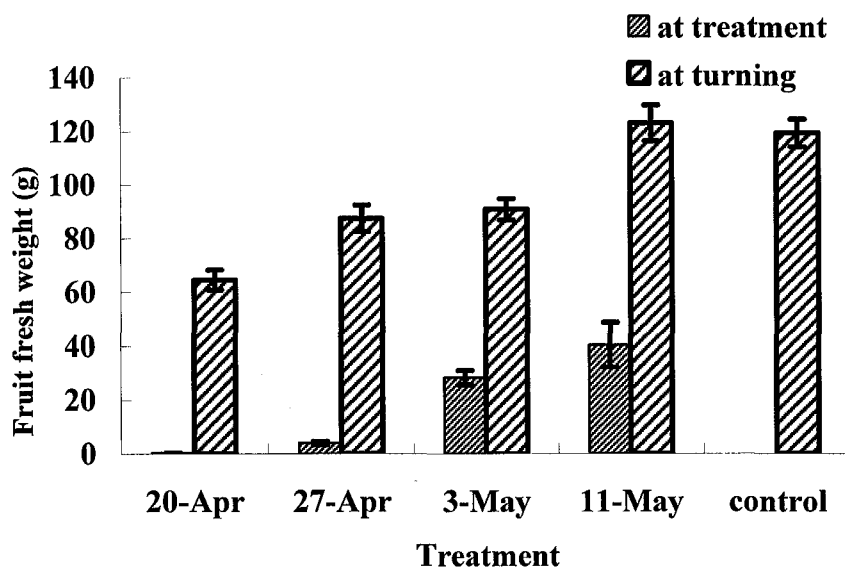


Fig.2-3. Effect of 30 mg·l⁻¹ uniconazole on the parthenocarpic fruit fresh weight of the 'Severianin' tomato at turning. Flowers opened on April 11 ~ 21 were emasculated prior to anthesis and were dipped in 30 mg l⁻¹ uniconazole on April 20, April 27, May 3 or May 11. Vertical bars represent standard error.

Table 2-1. Growth and abscission in two-week-old 'Severianin' tomato fruits treated with uniconazole (5, 10 and 50 mg l⁻¹) at zero, three, five and ten days after anthesis.

Concentration of uniconazole	Treatment time ^y	Enlarged fruit (%)	Dropped fruit (%)	Stopped fruit (%)	Fresh weight ^z (g)	Fruit diameter (FD) (mm)		
5 mg l ⁻¹	0 DAA	53.8	23.1	23.1	45.0	a ^x	47.4	ab
	3 DAA	53.3	6.7	40.0	19.1	c	35.5	d
	5 DAA	92.9	7.1	0	28.2	bc	40.8	cd
	10 DAA	100.0	0	0	24.5	bc	38.5	cd
10 mg l ⁻¹	0 DAA	68.8	18.8	12.5	28.2	bc	40.7	bcd
	3 DAA	86.7	6.7	6.7	28.0	bc	38.4	cd
	5 DAA	84.7	7.7	7.7	31.0	bc	42.3	bc
	10 DAA	100.0	0	0	27.0	bc	40.1	cd
50 mg l ⁻¹	0 DAA	20.0	20.0	60.0	52.5	a	51.1	a
	3 DAA	46.7	6.6	46.7	23.6	bc	38.3	cd
	5 DAA	73.3	13.3	13.2	33.1	b	41.7	bcd
	10 DAA	100.0	0	0	26.9	bc	40.0	cd
Control	-	100.0	0	0	28.9	bc	40.8	cd

		Pericarp thickness (Pe) (mm)	Pe/ FD (%)	Placenta thickness (Pl) (mm)	Pl / FD (%)	Columella diameter (CD) (mm)	CD / FD (%)
5 mg l ⁻¹	0 DAA	3.5 a	7.4	6.4 bcd	13.5	24.6 a	51.9
	3 DAA	2.8 c	7.9	7.3 abc	20.6	13.2 e	37.2
	5 DAA	3.2 ab	7.8	7.3 Ab	17.9	18.0 cde	44.1
	10 DAA	3.2 ab	8.3	6.7 abcd	17.4	17.0 de	44.2
10 mg l ⁻¹	0 DAA	2.9 bc	7.1	6.3 bcd	15.5	22.0 bcd	54.1
	3 DAA	2.9 bc	7.6	6.0 Cd	15.6	19.4 bcd	50.5
	5 DAA	3.2 ab	7.6	7.4 Ab	17.5	20.4 bcd	48.2
	10 DAA	3.3 ab	8.2	7.4 A	18.5	16.8 de	41.9
50 mg l ⁻¹	0 DAA	3.6 a	7.0	5.8 Cd	11.4	29.8 a	58.3
	3 DAA	3.0 abc	7.8	5.5 D	14.4	19.0 bcde	49.6
	5 DAA	3.1 abc	7.4	7.0 abcd	16.8	22.0 bc	52.8
	10 DAA	3.1 abc	7.8	6.2 bcd	15.5	19.6 bcd	49.0
Control	-	3.3 a	8.1	7.5 A	18.4	17.8 cd	43.6

^z Enlarged fruits are weighed at 2 weeks after anthesis

^y DAA means days after anthesis

^x Means followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test(5%)

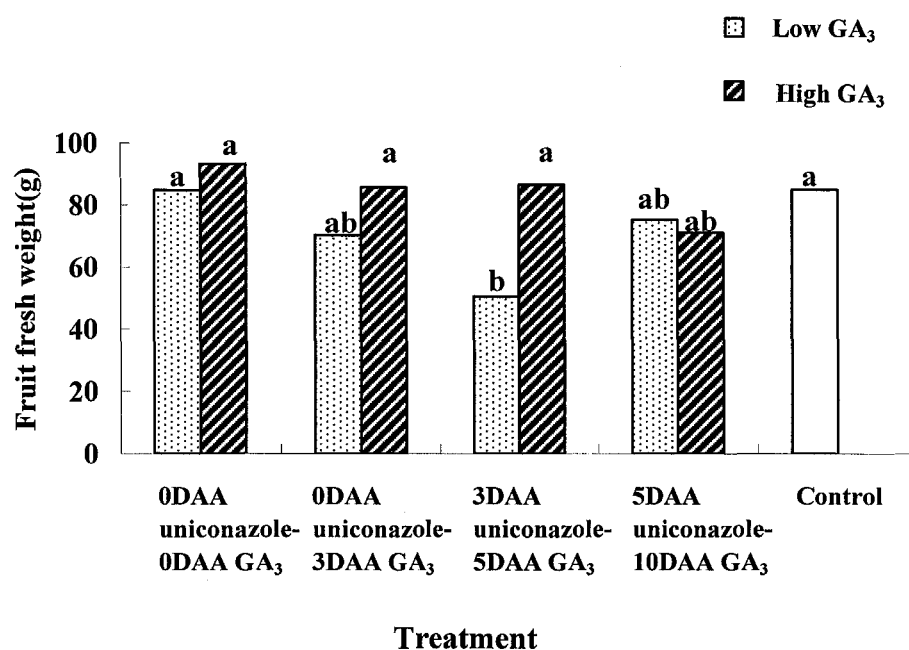


Fig.2-4. Fruit fresh weight at six weeks after anthesis of parthenocarpic fruits of 'Severianin' tomatoes treated with uniconazole ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) together with or followed by the treatment with gibberellic acid (GA_3 , 5 or $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), DAA: days after anthesis. Different letters on the column represent significant difference by Duncan's multiple range tests (5%).

第2節 ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールが‘Severianin’の偽胚発達に及ぼす影響

‘Severianin’は *pat-2* 遺伝子による単為結果性トマト品種であり、受精に不適当な環境条件下でも正常な大きさの果実を生産できる (Lukyanenko, 1991). この品種の無種子果実には、オーキシン誘導単為結果果実で見られる偽胚と同様の偽胚が見られる (Lin et al., 1983). 非単為結果系統トマトのオーキシン誘導単為結果果実で見られる偽胚は、珠皮最内層の細胞に由来し (Asahira et al., 1967), 珠皮最内層の細胞が胚嚢中心部へむけ伸長し、その後細胞分裂を繰り返して胚珠中心部に細胞塊を作ることによって形成される. この細胞塊は、トルイジンブルー O によって強く染色されるが、ある程度まで生長した後、収縮し始め、果実が赤熟したときには退化している. 遺伝的単為結果果実とオーキシン誘導単為結果果実におけるこのような相似は、偽胚の発達が果実の着果と発達に密接に関与していることを示していると考えられる. Varga and Bruinsma (1976)は、発達中のトマト果実における種子とオーキシンの役割について検討し、トマト果実の生長は種子の生産するオーキシンによる細胞伸長によるものではなく、発達中の種子によって形成されるシンク能に依拠すると述べている. この種子の代替として、単為結果果実では、発達中の偽胚が果実発育の制御において働いている可能性がある.

ウニコナゾール ((E)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2(1,2,4-triazol-1-yl)-1-penten-3-ol)は、ジベレリン生合成阻害剤であり (Izumi et al., 1985), 前述したように、ごく若いトマト果実にウニコナゾールを処理すると、内生ジベレリンレベルが急激に低下し、‘Severianin’の着果と果実肥大が抑制される. 処理が早い時期であるほど、最終的な成熟時の果実重は小さくなり、また、ウニコナゾールの抑制効果は GA₃ 処理によって打ち消された. これらのことから、内生ジベレリンが ‘Severianin’ トマトの着果と果実肥大に重要な役割を果たしていることが推測される.

そこで、本節ではウニコナゾールとジベレリンを組み合わせる果実肥大を制御した場合の偽胚の発達について組織学的観察を通して検討した.

1. 材料および方法

1992 年 1 月に ‘Severianin’ の自殖種子を播種し、斉一な生育の苗を選んで、加温ガラス室内の水耕栽培ベッドに移植した。3 月 20 日～31 日に開花した第 1 花房の第 2 花と第 3 花を供試した。各処理約 20 個体を供試し、全て開花前に除雄し、ウニコナゾール 5mg l^{-1} とジベレリン (GA_3) 50 mg l^{-1} 溶液を用いて以下のように花房を処理した。1) 開花時に GA_3 溶液に浸漬、2) 開花時にウニコナゾール溶液に浸漬、3) 開花後 3 日目にウニコナゾール溶液に浸漬、4) 開花後 3 日目にウニコナゾール溶液に浸漬した後、2 日後にジベレリン溶液に浸漬、5) 対照区として開花時に水に浸漬。以上の 5 区それぞれについて、開花後 3, 5, 10 および 20 日目に果実を収穫し、新鮮重を測定した後、FAA (エタノール 12 : 水 6 : ホルマリン 1 : 氷酢酸 1, v/v) で固定・保存した。固定した組織から胎座を含む胚珠を切り出し、流水で洗浄後エタノールシリーズで脱水した。エタノールを Technovit 7100® 樹脂で置換し、同樹脂で包埋した。ロータリーミクロトームで $5\mu\text{m}$ 厚さに薄切しトルイジンブルー O (O'Brien and McCully, 1981) で染色して光学顕微鏡で観察した。

2. 結果および考察

偽胚の組織学的観察から、以下のように偽胚の発育段階を分類した。

stage 0: 珠皮最内層が肥厚していない (第 2-5 図 A)

stage 1a: 珠皮最内層が肥厚し、濃く染まっている。珠皮の崩壊が始まっている (第 2-5 図 B)

stage 1b: 珠皮最内層が肥厚しているが、染色は弱い。珠皮の崩壊が認められない。

stage 2a: 珠皮最内層の細胞が増殖し、胚嚢内部に 2 層から 3 層の染色性の高い細胞の層を形成している。珠皮の崩壊が進行している。

stage 2b: 2a と同様に珠皮最内層の細胞が増殖しているが、染色性が低い (第 2-5 図 D)。

stage 3: 胚嚢内に染色性の高い細胞が 4 層以上になり、充満している (第 2-5 図 C)。

開花後 3 日目では偽胚は stage 0 であった。開花後 5 日目以降では stage 1a, 2a が増加した。開花後 20 日目では, stage 3 の偽胚が観察されると同時に, stage 1b, 2b の偽胚も存在した。果実重の変化から判断すると, 本実験においては果実肥大の開始が遅く, 開花後 10 日目で 0.03g, 開花後 20 日で 10.1g にしか達していなかった。このことから開花後日数のわりに果実肥大段階は遅れているとすると, ‘Severianin’ の単為結果果実における偽胚の発育は, オーキシン誘導単為結果果実における発育 (Asahira et al., 1967) とほぼ同様であると考えられた。つまり, まず珠皮最内層の細胞が内側に向かって伸長し, 細胞分裂を始める。このとき珠皮最内層に接した珠皮組織は崩壊を始める。胚嚢内で分裂した細胞は層を形成した後やがて胚嚢内部いっぱいになり, 同時に珠皮細胞の崩壊, 消化が進行する。この細胞は活発に細胞分裂しているためにトリイジンブルーなどの染色剤で濃く染色される。成熟が進むと偽胚は崩壊を始め, 赤熟した果実の偽胚は完全に崩壊していた (第 2-5 図 E)。

開花時ウニコナゾール処理区では, 処理直後に落果する果実が多く, 残った果実もほとんどが肥大せず, 開花後 5~12 日の間に落果した。この落果した果実について, 偽胚を観察すると stage 0 であった (第 2-2 表)。開花時の胚珠とほとんど変わらない状態で珠皮最内層の肥厚や分裂した形跡は認められなかった。

開花後 3 日目にウニコナゾール 5mg l^{-1} で処理すると, すべての果実が着果したが, 肥大は抑制され, 20 日目で 0.06 g であった。開花後 5 日目 (処理後 2 日) でも偽胚は stage 0 であり, 開花後 10 日目果実で, stage 0, 2a, 2b が混在して見つかかり, 開花後 20 日目では stage 1b, 2b が観察された。これ以上に発達した偽胚は発見されず, また stage 2b は, 珠皮最内層の細胞群の活性は低い状態であると考えられた。

開花後 3 日目にウニコナゾール 5mg l^{-1} を処理した後, 続いて開花後 5 日目に GA_3 50mg l^{-1} を処理した区では, 果実肥大は回復し, 対照区と同等またはそれ以上の重さになった。偽胚は開花後 10 日目で stage 0 から stage 3 が混在し, 開花後 20 日目では stage 2a, 2b, 3 が混在していた。開花後 10 日目の果実で stage 3 の偽胚が見つかるなど, 対照区と同等またはそれ以上に進行しているように思われた。

開花時に GA₃ 50mg l⁻¹ で処理した区では、果実の肥大が無処理区よりもわずかに促進された。偽胚は開花後 3 日目で stage 0, 1a が混在し、5 日目で stage 2a, 10 日目で stage 3 が存在し、対照区よりも偽胚の発達がわずかに早い傾向が認められた (第 2-2 表)。いったん偽胚形成に方向付けられたもののその後分裂活性を失ってしまったと考えられる stage 1b および 2b の偽胚は GA₃ 処理を行った区では見あたらなかった。さらによく染色された細胞が方向性なく分裂して胚嚢からあふれ出したように見える胚珠が見られた (第 2-5 図 F)。

以上のように、‘Severianin’ において果実肥大をウニコナゾールや GA₃ によってコントロールした時、偽胚の分裂活性や発達も平行してコントロールされていることが明らかとなった。前述したように、‘Severianin’ 果実の単為結果能力や果実肥大に開花期から肥大初期の内生ジベレリン量が深く関与していることを考えあわせると、内生ジベレリンによる偽胚発達のコントロールの可能性がある。スイカでは GA 20 位酸化酵素遺伝子 (*Cv20ox*) が種子発育初期に内珠皮で特異的に発現し、かつ、CPPU による単為結果果実においては受粉果実よりもさらに早い時期に発現することが報告されている (Kang et al., 1999)。トマトの花蕾から幼果におけるジベレリン生合成関連酵素遺伝子の発現については、生合成のごく初期の過程であるゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGDP) から ent-コパリル 2 リン酸への反応を行う酵素をコードする遺伝子 (*LeCPS*) や、GA₁₂ から GA₂₀ への反応に関与する GA 20 位酸化酵素をコードする遺伝子 (*Le20ox-1*, *Le20ox-3*) の転写が開花以降上昇して幼果で高いレベルに達すること、GA₂₀ から活性ジベレリン GA₁ への反応を行う GA3 β 水酸化酵素をコードする遺伝子 (*Le3OH-2*) の転写が開花時に高いレベルを示すこと、また開花以前の花蕾発達過程において GA 20 位酸化酵素をコードする遺伝子 (*Le20ox-2*) の転写が胎座部で特異的に起こっていることが報告されており (Rebers et al., 1999)、花蕾発達から開花、幼果にいたる子房の発達にジベレリン生合成反応が深く関与していることを示唆すると考えられる。

本実験の対照区においては、果実肥大の速度が遅く、1 個の果実内において様々なステージの偽胚が観察され、いったん偽胚形成が開始しながら、分裂活性を失ったようにみられる偽胚が少なからず存在した。このことは本実験の環境がトマト生育に必

ずしも適当でなかったためであると思われる。このような条件下で開花時に GA_3 50mg l^{-1} で処理した区では、果実の肥大が無処理区よりもわずかに促進された。同時に偽胚の発達も促進され、無処理区で混在していた stage 1b, 2b などの発育を停止した偽胚が見られなくなり、開花後 20 日目で stage 3 の偽胚をみるが多かった。また、胚珠の内腔からはみ出して増殖しているような胚珠が観察されており、開花時のジベレリン処理によって珠皮最内層の細胞の分裂活性が上昇することが示唆された。*pat* 遺伝子による単為結果変異系統のトマトでは、開花前の子房肥大と胚珠発達と同時に、雄しべの萎縮、珠皮の発達が不十分などの奇形が観察されている (Mazzucato et al., 1998)。彼らは胚珠の大きさと珠皮の不完全な縫合について報告しており、偽胚の発達に関して指摘していないが、開花後 6 日目の *pat* 変異系統の胚珠切片の図では、珠皮最内層の崩壊と胚珠内部に大きくて染色性の低い細胞が 2 層ほど充満している様子が明らかで、本実験における stage 2b と類似した形態であることが伺える。著者らは非単為結果性品種‘強力旭光’においてジベレリンによって単為結果を誘導した際、果実中に stage 1b および 2b の偽胚を観察した (未発表データ)。一方、*pat* 変異系統の子房は、開花後 4 日目に野生型に比較して高いジベレリン量を示しており (Mapelli, 1978)、両者の相似は興味深い。また、花房分化期のジベレリン処理は雄しべの変形を修復するが、有種子果を増加させず、子房あるいは胚珠の開花前からの発達や珠皮未発達による珠孔の不完全形成などに起因する受精阻害を克服することはできないと報告されている (Mapelli, 1979) が、本実験の結果は、開花前のジベレリン処理が珠皮最内層の分裂を促進することを示しており、受精にはむしろ阻害方向で働くことが予想される。

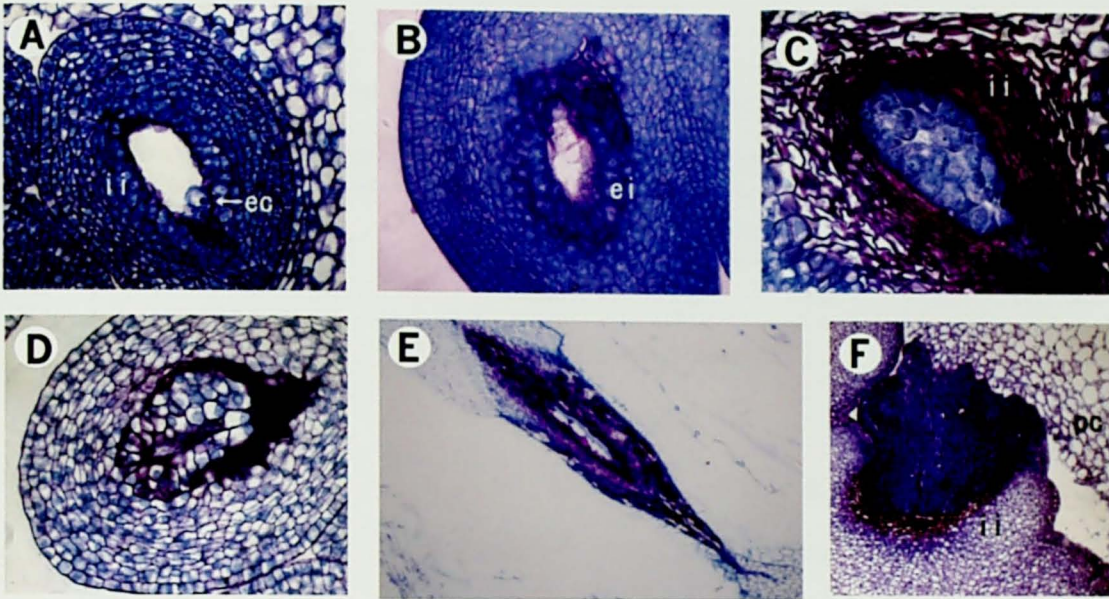


Fig. 2-5. Sections of pseudoembryos observed in the genetic parthenocarpic tomato cultivar 'Severianin', which were stained with toluidine blue O. (A) Stage 0, at anthesis. Egg cell (ec), inner integument (ii), 400x. (B) Stage 1a, innermost cell layer of the integument has elongated and the adjoining cells of the inner integument appeared to have degraded. Elongated innermost integument (ei), 400x. (C) Stage 3, highly stained cells occupy the ovule cavity and degradation of adjoining cells of inner integument is in progress, 400x. (D) Stage 2b, innermost cell layer of the integument is elongated and poorly stained, 400x. (E) Collapsed ovule observed in a mature red fruit, 100x. (F) Abnormal pseudoembryo observed in 20-day-old fruit treated with GA_3 at anthesis, with well-stained cells proliferating without constraint and overflowing from the embryo sac. Inner integument (ii), pericarp (pc), 400x.

Table 2-2. Effect of uniconazole (U, 5 mg l⁻¹) and GA₃ (50 mg l⁻¹) applied at 0, 3 or 5 days after anthesis on the development of pseudoembryos in 'Severianin' tomato

	Days after anthesis			
	3	5	10	20
	Developmental stage ^z			
Control	0	0, 1a	0, 1a, 2a	1b, 2b, 3
U at anthesis	0	- ^w	(0) ^x	-
U 3DAA ^y	-	0	0, 2a, 2b	1b, 2b
U 3DAA + GA ₃ 5DAA	-	-	0, 1a, 1b, 2a, 2b, 3	2a, 2b, 3
GA ₃ at anthesis	0, 1a	0, 1a, 2a	0, 2a, 3	3

^z (0) Pseudoembryo not developed, (1a) endothelial integument cells were well

stained and thickened ,

(1b)poorly stained and thickened, (2a)well stained with 2-3 layers, (2b)poorly stained with 2-3 layers,

(3) well stained and occupied the embryo sac cavity.

^y DAA means days after anthesis.

^x Data of the fruits abscised from 5 to 12 days after anthesis.

^w No data.

第3節 オーキシン誘導単為結果果実におけるウニコナゾール及びジベレリン処理が果実肥大と偽胚発達に及ぼす影響

前節において遺伝的単為結果系統‘Severianin’の果実肥大初期においてジベレリン生合成阻害剤やジベレリンの外生的処理によって果実肥大が制御されると同時に、偽胚の発達も同様な影響を受けることを明らかにし、果実肥大が偽胚発達と同調していることを示した。そこで本節では、一般的な非単為結果性系統を用いて、同様に内生ジベレリンを制御し、果実肥大と偽胚発達について検討した。

1. 材料および方法

1992年7月9日にトマト‘強力旭光’を播種し、7月29日、生育の揃った苗を選び、ビニールハウス内においた24cmポットに粒状ロックウールで定植した。施肥は1ポットあたりロング70®(14N-12P-14K)100g、炭酸苦土石灰7gをはじめに用い、適宜灌水した。開花前にあらかじめ除雄しておいた花のうち、8月20日～25日に開花したものを1株あたり2花選び開花日を記録し、他は除去して処理を行った。開花した当日に15mg l⁻¹の4CPAに浸漬した後、0、5および10日目にウニコナゾール50mg l⁻¹に浸漬した区を設定した。4CPA処理後0日目ウニコナゾール処理区は4CPAとウニコナゾールの混合液で浸漬した。また、開花した当日、15mg l⁻¹の4CPAと50mg l⁻¹のウニコナゾールの混合液に浸漬した後、5日目と10日目にジベレリン(GA₃)100mg l⁻¹に浸漬処理した区を設定した。開花後0、5、10、15、20および30日目に果実を収穫し、果実新鮮重を測定した後、FAA液中に果実または一部を切り取って固定・保存した。保存組織から胎座を含む胚珠を切り出し、流水で洗浄後エタノールシリーズで脱水した。エタノールをTechnovit®7100樹脂で置換し、同樹脂で包埋した。ロータリーミクロトームで5μm厚さに薄切しトルイジンブルーO(O'Brien & McCully, 1981)で染色して光学顕微鏡で観察した。偽胚の発達段階については前節と同様に分類した。

2. 結果および考察

開花期の気温が高かったためと考えられるが、果実肥大は前節の実験よりもかなり早く進み、対照区の果実重は 10 日目に 12.1g になった。偽胚の発達は、胚珠内部に染色性の高い細胞が充満する stage 3(第 2-6 図 A)よりも進んで、細胞数が多いが染色性が低下している偽胚(第 2-6 図 B)や、一部の細胞がつぶれて隙間ができている偽胚が観察された(第 2-6 図 C)。前者を stage 4、後者を stage 5 とした。ウニコナゾール処理による偽胚発達の遅延は明瞭ではなかった。開花時のオーキシシン処理にウニコナゾールを混用した場合でも偽胚は stage 4 に達していた(第 2-3 表)。果実肥大は、ウニコナゾールによって初期には抑制され、開花後 20 日目の果実重については処理時期が早いほど小さくなった。また、この果実肥大の阻害は開花後 5 日目または 10 日目の GA_3 処理によってある程度克服された。これらの結果は ‘Severianin’ の結果と一致する。しかし、その差は開花後 30 日目には小さくなり、統計的に十分有意な差は認められなかった。

非単為結果性の経済品種 ‘強力旭光’ のオーキシシン誘導単為結果トマト果実においては、ウニコナゾール処理による着果抑制、果実肥大阻害および偽胚の発達抑制が ‘Severianin’ の場合よりも、相対的に小さいと考えられた。

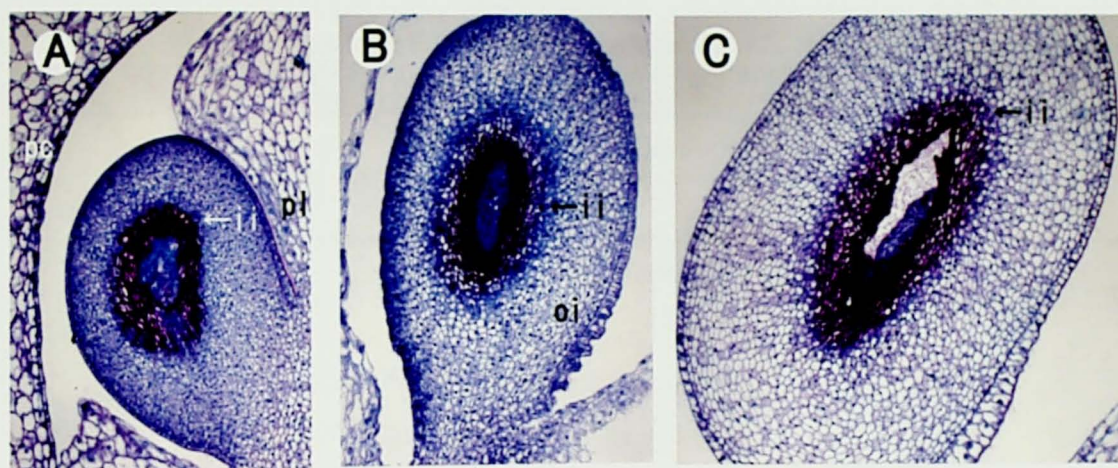


Fig.2-6. Sections of pseudoembryos observed in 4CPA-induced 'Kyouryoku-kyokkou' tomato fruits, which were stained with toluidine blue O. (A) Stage 3, highly stained cells in the ovule cavity and degradation of inner integument in progress. Pericarp (pc), placenta (pl) and inner integument (ii), 100x. (B) Stage 4, outer integument (oi), inner integument (ii), 100x. (C) Stage 5, there is a small gap in the ovule cavity. Inner integument (ii), 100x.

Table 2-3. Effect of uniconazole (U, 50mg l⁻¹) and gibberellic acid (GA₃, 100mg l⁻¹) applied at 0, 5 and 10 days after anthesis on the development of pseudoembryos and the fresh weight of the 4CPA-induced parthenocarpic fruits in 'Kyouryoku-Kyokkou' tomato fruits.

Treatment	Days after anthesis				
	0	5	10	20	30
Developmental stage ^z					
U 0 DAA ^y	- ^x	2a, 3	4	4	-
U 5 DAA	-	-	4	4	-
U 10 DAA	-	-	-	5	-
U 0 DAA + GA ₃ 5 DAA	-	-	4	4	-
U 0 DAA + GA ₃ 10 DAA	-	-	-	4, 5	-
Control	0	3	4	4, 5	-
Fruit fresh weight (g)					
U 0 DAA ^y	-	0.70 a ^w	4.19 B	38.8 c	118.2 a
U 5 DAA	-	-	9.74 A	49.6 c	116.7 a
U 10 DAA	-	-	-	68.1 b	130.3 a
U 0 DAA + GA ₃ 5 DAA	-	-	7.69 B	67.7 b	143.6 a
U 0 DAA + GA ₃ 10 DAA	-	-	-	57.7 b	115.3 a
Control	0.01	1.05 a	12.10 A	86.9 a	135.1 a

^z Endothelial integument cells were not developed (0), Well stained cells formed 2-3 layers (2a), occupied the embryo sac cavity (3). Cells in the cavity divided more and stainability become lower (4). A part of pseudoembryo was degraded and a gap occurred in the cavity (5) .

^y DAA means days after anthesis.

^x No data.

^w Values followed by the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test (P=0.05)

第4節 総合考察

トマト果実発達における内生植物生長調節物質の変動と役割については多くの報告がある。トマトの果皮細胞数は開花後約1週間から10日で最高に達し、それ以降は細胞の体積増加によって果実重が増えていく (Mapelli, 1978)。内生ジベレリンレベルは開花時にいったん低下した後に上昇し、開花後約2週間で最大に達し、その後減少する (Gillaspy, 1993)。この変化はオーキシン誘導単為結果果実 (Koshioka et al., 1994) でも、*pat-2*誘導単為結果性系統 ‘Severianin’ (Fos et al., 2000) でも同様である。本実験では、この開花直後から10日間の内生ジベレリンレベルが上昇する期間に、ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールを処理し、開花直後の早い時期の処理によって着果や果実肥大が強く抑制されることを明らかにした。この阻害は直後のジベレリン処理によって回復することから、内生ジベレリンレベルの低下が原因であり、果皮の細胞分裂に対するジベレリンの関与を示唆するものと思われる。アラビドプシスでは、単為結果性変異 *fwf* およびジベレリン非感受性変異 *gai-1* を用いた実験で、中果皮細胞の垂層分裂と肥大にジベレリンが必要であることが示されている (Vivian-Smith et al., 2001)。彼らは、遺伝子 *FWF* が支配する果実の肥大・発達の停止機能を受粉・受精が解除する過程にオーキシンが介在しており、この *FWF*-オーキシン過程とジベレリンによる果皮細胞の分裂・伸長促進過程とは独立であるとする果実肥大制御モデルを提示している。

本実験において特にジベレリンレベルが重要であると考えられた開花後3日から5日は、受粉果実においては胎座の細胞分裂、胚発達の初期 (球状胚形成) および珠皮の細胞分裂期にあたる。単為結果させた ‘Severianin’ 果実を開花後3日目にウニコナゾールで処理すると、落果はしなかったが、肥大は顕著に抑制され、同時に胚嚢内部には染色性の薄い1～2層の大型の細胞からなる偽胚 (stage 1b, 2b) が観察された。ウニコナゾールに引き続いてジベレリンで処理した果実は、対照区と同程度に肥大し、かつよく発達した偽胚をもっていた。

果実肥大初期のウニコナゾール処理による果実肥大の抑制は、‘Severianin’ の受粉果実でも認められた (第1節, 実験2)。しかし、このようなウニコナゾールによる果実肥大と偽胚発達の阻害は、非単為結果系統 ‘強力旭光’ のオーキシン誘導単為結果果実では緩やかであった。このことはオーキシン誘導単為結果では肥大過程制御におけるジベレリンへの依存が小さいことを示しているのかもしれない。

第5節 摘要

遺伝的単為結果性品種‘Severianin’および非単為結果性の経済品種‘強力旭光’を供試し、ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールとジベレリン (GA_3) を組み合わせて処理し、着果および果実肥大と偽胚発達に及ぼす影響を調査し、トマト単為結果果実の果実肥大におけるジベレリンの関与について検討した。

‘Severianin’の果実肥大初期の主な内生ジベレリンとして GA_{19} および GA_{20} の活性が認められ、ウニコナゾールの浸漬処理によって処理後 3 日目にはほとんど検出されないほどに低下し、4 週間目まで回復しなかった。

ウニコナゾールの‘Severianin’の花房浸漬処理は着果率を低下させ、果実肥大を抑制した。このとき、偽胚の発達も同時に抑制された。

濃度を2段階とした GA_3 (5 または 50 $mg\ l^{-1}$) をウニコナゾール(5 $mg\ l^{-1}$)処理後の異なる時期に与え、ある一定の期間におけるジベレリンの影響を検討した。ウニコナゾールを開花後 3 日目に与え、その 2 日後 GA_3 を 5 $mg\ l^{-1}$ 与えたとき、果実重は対照区よりも有意に減少しており、それ以外の GA_3 との組み合わせ処理では、ほとんど対照区と同等に回復したことから、開花後 3 日から 5 日目の期間の高い内生ジベレリンレベルが、果実生長に必要であることが示唆された。

開花後 3 日目にウニコナゾールで処理し、その 2 日後に $GA_3\ 50\ mg\ l^{-1}$ で処理すると、果実肥大は対照区と同等まで回復した。このとき、偽胚の発達も回復していた。

‘強力旭光’でも同様の傾向は認められたが、‘Severianin’よりもその影響は小さかった。

第3章 偽胚の発達様相と単為結果トマト果実の肥大との関係について

第2章では、遺伝的単為結果性品種‘Severianin’においてジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールを処理すると、初期の果実肥大と偽胚の発達の双方が阻害され、果実発達段階と偽胚の発達程度がよく対応することが明らかとなった。本章では、オーキシシン処理の時期の違いによって果実肥大を制御した場合や、異なる果実発達の様相を示す遺伝系統の場合での偽胚の発達と果実肥大の同調性について検討した。

第1節 非単為結果系統トマトにおけるオーキシシン処理の時期が果実肥大と偽胚発達に及ぼす影響

pat-2 による単為結果性品種‘Severianin’では、ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールの処理によって初期の果実肥大と偽胚の発達を抑制すると、果実肥大の程度と偽胚の発達程度が非常によく対応し、発達が同調していることが明らかとなった。しかし、非単為結果性の経済品種‘強力旭光’では、‘Severianin’の場合のようなウニコナゾールによる強い着果抑制、肥大抑制、偽胚の発達抑制は見られなかった。

一方、一般的なトマトの経済栽培においては、開花前に合成オーキシシンで処理すると果皮の肥大が顕著に促進され、空どう果の発生が増加する傾向が広く認められている。また、オーキシシン処理によって果実肥大が開始するために、開花前から開花後まで異なる開花段階の花が混在するにも関わらず、同一花房内での果実肥大が同調し、果実重のばらつきが小さくなることが経験的に知られている。

そこで、ここでは経済品種である非単為結果性トマト品種‘強力旭光’を供試し、開花後の異なる時期に合成オーキシシン処理した場合の果実肥大と偽胚の発達の対応について検討した。

1. 材料および方法

1992年7月9日に播種した非単為結果性トマト経済品種‘強力旭光’の苗から7月29日に生育のそろった苗を選び、粒状ロックウールを詰めた24cmポットに定植して無加温ビニールハウス内で栽培した。施肥は1ポットあたりロング70®(14N-12P-14K)100g、炭酸苦土石灰7gを用土に混入した。すべての花蕾は開花前に除雄し8月20日から8月25日まで

の間に開花した花を 1 株当たり 2 または 3 花を選び実験に用いた。処理は、4 CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) の 15mg l^{-1} 溶液に花房を浸漬した。処理時期は、開花した当日、開花後 5 日目および開花後 10 日目とし、その時点まで残っている花房を選んで処理を行った。それぞれ、開花後 0, 5, 10, 15, 30 日目に果実を収穫し、果実新鮮重を測定した後、FAA (エタノール 12 : 水 6 : ホルマリン 1 : 氷酢酸 1, v/v) で固定し、光学顕微鏡による組織観察まで保存した。

2. 結果および考察

偽胚の組織学的観察から、‘Severianin’と同様に以下のように偽胚の発育段階を分類した。

stage 0: 珠皮最内層が肥厚していない。

stage 1a: 珠皮最内層が肥厚し、強く染色される。内側の珠皮の崩壊が始まる。

stage 1b: 珠皮最内層が肥厚しているが、染色は弱い。珠皮の崩壊が認められない。

stage 2a: 珠皮最内層の細胞が増殖し、胚嚢内部に 2 層から 3 層の染色性の高い細胞の層を形成している。珠皮の崩壊が進行している。

stage 2b: 珠皮最内層の細胞が増殖し、胚嚢内部に 2 層から 3 層の細胞の層を形成しているが染色性は低い。珠皮の崩壊は進んでいない。

stage 3: 胚嚢内に染色性の高い細胞が充満している。

stage 4: 細胞数が増加して胚嚢内に層状になり、染色性は前の stage 3 よりも低下している。

stage 5: 胚嚢内に空隙がみえる。

stage 6: 偽胚が崩壊している。

開花当日の胚珠は直径約 0.14~0.18mm で、珠皮は約 10 層からなる染色性の高い細胞層が緻密に配列しており、胚珠内部には卵細胞や助細胞が観察された (第 3-1 図 a, stage 0)。

開花時に 4CPA 処理をした果実では、開花後 5 日目で胚珠の直径は約 0.4mm になっており、胚嚢内部が染色性の高い細胞群で満たされており (偽胚)、それに接する珠皮の内側の層が紫色に染色され、崩壊しているように観察された (第 3-1 図 d, stage 3)。開花後 10 日目では胚珠の直径は約 0.5mm になり、胚嚢内を満たしている細胞群の密度が高まり、細胞が一定の配列をもっているように観察された。珠皮の外側の細胞が分化を始め、偽胚に接する珠皮内層の崩壊が進行していた (stage 4)。開花後 15 日目には胚珠が扁平になり、偽胚

の染色性が低下していた。偽胚が収縮して胚嚢内に空隙を生じている胚珠も見受けられた(stage 5)。開花後 20 日目になると、胚嚢内に空隙を生じた胚珠が多くなった。開花後 30 日目では、珠皮内層の細胞が崩壊して圧縮したような形態になり、珠皮の最外層は発達して薄い青色に染色された。偽胚組織は著しく収縮して青く染色された(stage 6)。

4CPA で処理しない果実では、開花後 5 日目及び 10 日目で開花時とほとんど変わらない胚珠(stage 0)か、または、珠皮最内層が肥厚しているが、染色性が低く、珠皮の崩壊が認められない胚珠(第 3-1 図 b, c, stage 1b) が観察された。5 日目に 4CPA を処理すると、処理後 5 日目(開花後 10 日目)で珠皮最内層の細胞が増殖し、胚嚢内部に 2 層から 3 層の染色性の高い細胞の層を形成して、珠皮の崩壊が進行している胚珠が認められた(stage 2a)。処理後 15 日目(開花後 20 日目)では stage 4 に達していた。

開花後 10 日目に 4CPA 処理した果実では処理後 10 日(開花後 20 日)目で stage 3~4(第 3-1 図 d), 処理後 20 日目(開花後 30 日目)で stage 4 となった。果実重の変化は同様に、4CPA 処理した後果実肥大が開始した(第 3-1 表)。しかし、処理後 15 日目にあたる、開花後 20 日目の果実重(38.9g)よりも、開花時処理区の開花後 15 日目の果実重(48.6g)の方が重かった。また、処理後 20 日目で比較すると、開花時処理で 86.9g、開花後 10 日目処理で 60.9g となり、開花時処理の方が重かった。

以上の結果から、子房は 4 CPA 処理をするまでは開花前と同程度の大きさのままであるが、処理後速やかに肥大を開始し、同時に胚珠内では珠皮最内層の細胞分裂が開始し、偽胚が発達するが、4CPA 処理を行わないと、珠皮最内層細胞の肥厚は起こるものの珠皮最内層の細胞分裂および珠皮の消化崩壊は起こらないことが明らかとなった。4 CPA 処理した花房では光合成産物の分配増加の開始が早まることが認められており、果実の本来持っている肥大の潜在的能力の発揮が、4 CPA 処理による早期肥大開始(分配率増加)によって開始すると考えられている(宍戸および堀, 1989)。これらのことから、4CPA 処理によって誘導された偽胚の発達がシンク能に関わっており、Varga and Bruinsma (1976)のいう種子による強力なシンク活性に替わるものとして、果実肥大の初期過程に偽胚が働いている可能性がある。

4CPA 処理前の‘強力旭光’で見られた偽胚は、ユニコナゾールによって肥大を抑制した‘Severiain’で観察された stage 1b の偽胚とほとんど同じ形態であった。この stage 1b の偽胚は珠皮最内層の細胞が肥厚したものの、分裂せずに停止してしまい、分裂活性が低下している状態であると考えられた。

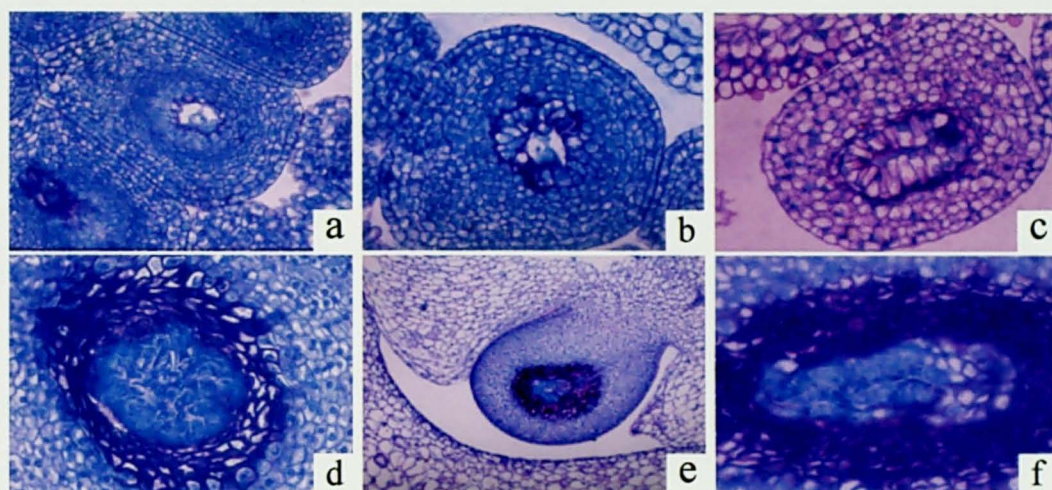


Fig. 3-1. Sections of pseudoembryos of 'Kyouryoku-Kyokkou' tomato induced by 4CPA applied at 0, 5 or 10 days after anthesis. Stained with toluidine blue O. (a); stage 0, at anthesis; (b) stage 1b, 5 days after anthesis without 4CPA treatment. (c) stage 1b, 10 days after anthesis without 4CPA treatment; (d) stage 3, 5 days after 4CPA treatment at anthesis; (e) stage 4, 5 days after 4CPA treatment at 5 days after anthesis; (f) stage 4, 10 days after 4CPA treatment at 10 days after anthesis.

(a): x100 (b) – (f): x400. ii: inner integument. oi: outer integument. ex; egg cell. pe; pseudoembryo.

Table 3-1. Effect of 4CPA application at 0, 5 and 10 days after anthesis on the development of pseudoembryos and the fresh weight of the parthenocarpic fruits in 'Kyouryoku-Kyokkou' tomato.

Treatment	Days after anthesis					
	0	5	10	15	20	30
Developmental stage ¹						
At anthesis	0	3	4	4, 5	4, 5	5, 6
5 DAA ²	- ³	0, 1b	2a	-	4	4
10 DAA	-	-	1b	-	3, 4	4
Fruit fresh weight (g)						
At anthesis	0.01	1.05 a ⁴	12.10 a	48.6	86.9 a	135.1 a
5 DAA	-	0.01 b	0.49 b	-	38.6 b	116.4 b
10 DAA	-	-	0.01 b	-	13.4 c	60.9 c

¹ (0) Inner integument cells did not develop; (1a) Innermost cell layer of inner integument stained well and enlarged; (1b) Innermost cell layer of integument stained poorly and enlarged; (2a) Innermost cell layer of integument was stained well and formed 2-3 layers; (3) Highly stainable cells occupied the whole ovule cavity; (4) The cells in the cavity divided more and stained poorly; (5) Pseudoembryo degraded and collapsed partly; (6) Pseudoembryo degraded entirely.

² DAA is days after anthesis.

³ No data.

⁴ Values followed by the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test (P=0.05).

第2節 開花前から果実肥大を開始するトマト系統‘MPK-1’における偽胚発達の様相

‘Severianin’の自殖後代を多数栽培するうちに、非常に単為結果性が強く、花卉およびがくが閉じた状態で子房が肥大する系統が見つかった。この系統は、開花（花卉展開）時に受粉しても種子は形成されず、挿し木栄養繁殖によって維持してきた。この系統の胚珠を開花前から観察したところ開花前に胚嚢内に偽胚が形成されており、このことが受精を妨げていると考えられた（未発表）。この系統を花粉親に用いて経済品種との交雑を試み、非単為結果性経済品種‘ミニキャロル’を種子親として交配し、そのF₂世代のうちから、特に強い単為結果性を示した個体を選び、‘MPK-1’と名づけた。‘Severianin’が心止まり性で、肩部の緑色が強い90g前後の果実をつけるのに対して、‘MPK-1’は非心止まり型の草姿（第3-2図）をしており、果実は20~40gの赤色果であるが、強い単為結果性を示し、成熟時の心室内にはゼリー部分が良く発達して空どう果にならない（第3-3図）。この‘MPK-1’系統について同一花房内での開花前の子房肥大と偽胚形成について観察した。

1. 材料および方法

非単為結果性経済品種‘ミニキャロル’を種子親に、単為結果性品種‘Severianin’の自殖後代のうち特に強い単為結果性を示した個体を花粉親として交配し、そのF₂世代のうちから、特に強い単為結果性を示した個体を選び、‘MPK-1’と名づけた。この個体から挿し穂を取り、栄養繁殖して2001年8月7日にIB化成25g l⁻¹を含むメトロミックスをつめた24cmポットに定植して無加温ビニールハウス内で栽培した。8月13日に第1花が未開花のまま子房が肥大している状態の花房を採取し、第1花から第4花までの子房径を測定後、FAA固定液で固定・保存して、光学顕微鏡による組織観察を行った。

2. 結果および考察

サンプリングしたとき、第1花はがく片に包まれた状態で開花しているとはいえない状態だったが、その子房は直径6mmになっており開葯は2,3日前に終わっていると思われる状態であった（第3-4図a）。胚嚢内部に2層から3層の染色性の高い細胞の層を形成している偽胚（第3-4図b, stage 2a）が存在した。第2花は子房径4mmで、開葯当日または1日後と思われる。第1花と同様に、stage 2aの偽胚が存在した（第3-4図c）。第3花は子房径3mmで染色性が高く肥大した珠皮最内層の細胞を持つ胚珠（第3-4図d, stage 1）

をもっていた。第4花は子房径 1.5mm で、まだ開葯しておらず、胚珠は偽胚が形成される以前の stage 0(第3・4図 e)であった。成熟時の果実の大きさは径 3.5 から 4cm であった。

‘MPK-1’ は開花時に受粉してもほとんど受精しないが、これは開花時にすでに胚嚢内を偽胚が占有しているためであると思われた。同様な受精阻害は、ブドウの単為結果品種

‘Black Corinth’ で、受粉後花粉管が胚珠に到達する時点ですでに胚嚢細胞が分裂し、退化していることが報告されている(Ledbetter and Ramming, 1989)。



Fig. 3-2. Plant of 'MPK-1' tomato.



Fig. 3-3. Transverse section of 'MPK-1' tomato fruit.

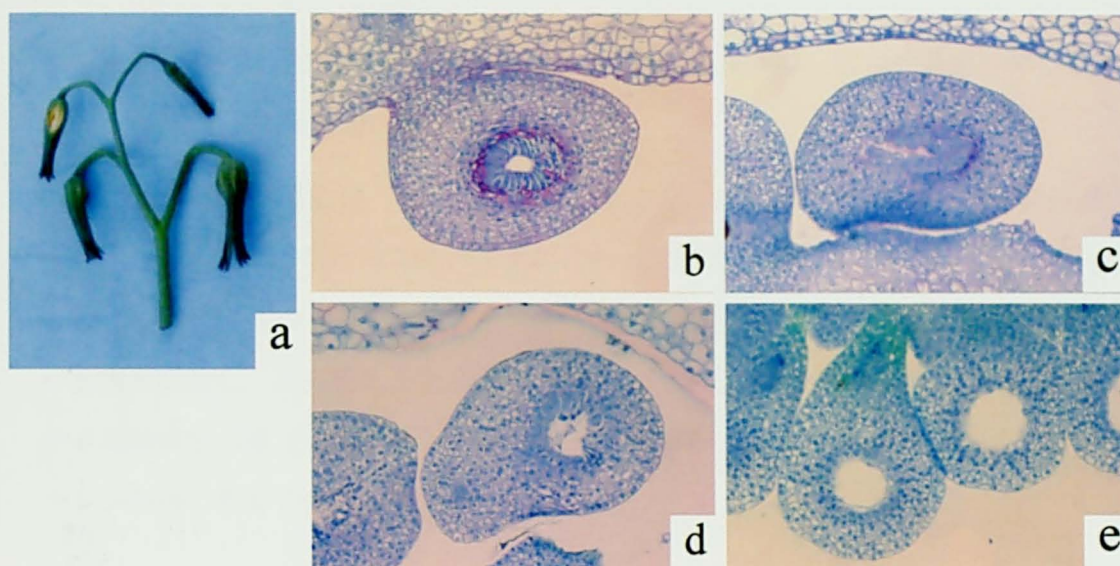


Fig. 3-4. Cluster and the sections of ovules of 'MPK-1' tomato before anthesis. Section were stained with toluidine blue O. (a) Cluster before anthesis. (b) Ovule of the first flower (stage 2a). Innermost cell layer of integument was well stained, enlarged and the adjoining cells of inner integument appeared to have degraded. (c) Ovule of the second flower (stage 2a). Highly stainable cells occupied the ovule cavity and the cells of inner integument are degrading. (d) Ovule of the third flower (stage 1). The cells of the innermost cell layer of integument enlarged but did not degrade. (e) Ovule of the fourth flower (stage 0). (b) – (e) x400.

第3節 着果した後、肥大しないトマト系統‘HOK-12’におけるオーキシン処理の影響と偽胚発達の様相

非単為結果性経済品種‘桃太郎’と、先述した‘MPK-1’とを用いた交配の後代のなかから、ほとんどの子房が開花時のままの状態、肥大しないまま落果することもなく、着果し続ける個体が見つかった。これを‘HOK-12’と名づけ、この系統について、種々の状態の果実を採取し、果実肥大と偽胚形成の様相との対応関係を明らかにしようとした。また、非単為結果性品種ではオーキシン処理によって果実の肥大が開始することから高濃度のオーキシン処理の影響を検討した。

1. 材料および方法

非単為結果性経済品種‘桃太郎’と‘MPK-1’とを用いた交配の後代のなかから、ほとんどの子房が開花時のままの状態、肥大しないまま落果することもなく、着果し続ける系統‘HOK-12’を選抜し、挿し木によって増殖して、IB化成25g l⁻¹をふくむメトロミックスをつめた24cmポットに植えて栽培し、結実と果実発達の様相を観察した。2001年11月中旬に加温ガラス室内で栽培し、開花4, 7, 10, 14, 21, 28, 80日後に肥大していない果実を採取し、FAAで固定保存して光学顕微鏡による組織観察を行った。2002年1月から2月、開花時に4CPA 60mg l⁻¹浸漬処理を行い、果実肥大と偽胚の発達を同様に観察した。

2. 結果および考察

‘HOK-12’はまれに自殖して有種子果をつけることがあり、その場合直径は4~5cmになり赤熟した。しかし、ほとんどの花は開花後肥大しないままの状態、あるものは開花後10日から20日の間に落果したが、あるものは80日後にも開花時と変化が無かった(第3-5図a)。肥大せずに着果している果実の胚珠を観察すると、開花後10日目までは開花日と変わらなかった(第3-5図e, f)。開花後14日および28日では珠皮最内層の細胞が大きくなっているが、染色性は低く、珠皮内側の崩壊も認められないstage 1b, 2bの偽胚が観察され(第3-5図g)、80日間着果していた果実の胚嚢内は大きくなった珠皮最内層由来の細胞で充満していた(第3-5図h)。染色性は低く、この時点での活性は低い、このわずかな生長が果実を落果させずに保持するために必要であったことを示していると思われた。開花後10日から20日の間に落果した子房では、非単為結果性品種‘強力旭光’の場合と同様、

最内層の肥厚はみられず、開花時と同じ形態(第 3-5 図 i, stage 0)であり、珠皮最内層の細胞が肥厚したり、分裂したりした様子は認められなかった。

開花時に 4 CPA 処理を行うと開花後約 10 日までにほとんどの子房は 2.5~3mm に肥大した後、それ以上大きくならなかったが(第 3-5 図 b), ごくまれに肥大を続けて赤熟まで達する果実があった(第 3-5 図 d). この肥大を続けた果実については開花後 21 日目に子房径 13mm に達した時点で(第 3-5 図 c) サンプリングし、胚珠を観察したところ、よく発達した偽胚(第 3-5 図 l, stage 4)が観察された。4 CPA 処理した果実では開花後 7 日目では珠皮最内層の肥厚が認められ、内側の珠皮の崩壊が開始していた。開花後 10 日目ではさらに偽胚の発達が進行して、染色性が高い stage2a の偽胚が存在した(第 3-5 図 j). その後、肥大を途中で止めた果実では、開花後 14 日目、21 日目の偽胚の染色性は低下し、偽胚細胞のそれ以上の増加は認められなかった(第 3-5 図 k, stage 2b). すなわち、果実肥大が起こっている間は染色性の高い分裂しつつある偽胚が存在し、肥大が停止してからは染色性が低下した偽胚に変わったと考えられた。

非単為結果性の品種では開花前後のただ一回のオーキシン処理で果実肥大が誘導され、果実は受粉果と同等あるいはそれ以上に発達する。また、トリプトファンからインドール酢酸(IAA)の前駆物質であるインドールアセトアミドを生成するトリプトファンモノキシゲナーゼをコードしている *iaaM* 遺伝子を、胎座部と胚珠で特異的に発現するように *DefH9* プロモーターとつないで導入したトマトやナスで、若い花蕾から幼果において導入遺伝子の発現が確認され、有種子果と同等またはそれ以上の大きさの単為結果果実が得られている(Ficcadenti et al., 1999 ; Rotino et al., 1997) ことから、開花前後のオーキシンが果実肥大を決定しているように思われる。しかし、本実験で用いた‘HOK-12’系統ではオーキシンの効果が継続しなかった。これは果実肥大過程において、オーキシンが着果・肥大のトリガーとして働いており、オーキシンによって誘導されるトマト果皮の肥大機構が存在することを示唆している。‘HOK-12’では、この着果後の果実発育を継続する過程においてなんらかの欠損があると考えられる。トマト有種子果の果皮の IAA 量は、生育全般を通じて種子に比べると少ないが、種子の IAA 量が開花後 2 週間前後にピークに達した後、漸減するのに対して、果皮の IAA 量は、開花後 1 週間、開花後 3 週間および果実肥大後期にあたる緑熟期の 3 回のピークがあり(Hocher et al., 1992), 単為結果性品種‘ルネッサンス’の緑熟期果実では胎座部よりも果皮の IAA 濃度が高い(Kojima et al., 2003) ことから、後半の果実肥大を維持するためのオーキシンは果皮そのもので生成されている可能性がある。

あるいはオーキシンを継続して反復処理によって、‘HOK-12’の果実肥大を継続させる
のかもしれない。

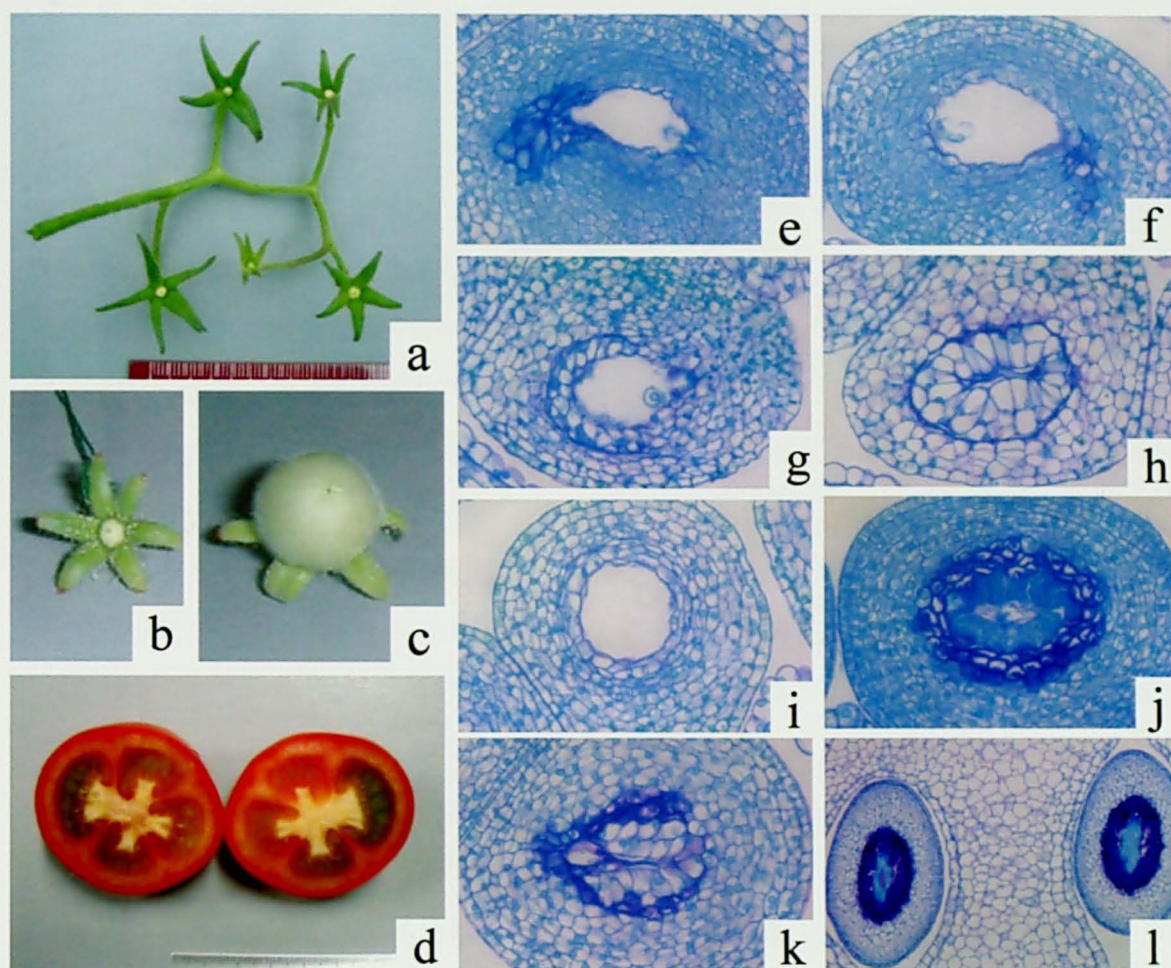


Fig.3-5. Fruits and sections of ovules observed in 'HOK-12' tomato. (a) Cluster at 80 days after anthesis. No fruits enlarged. (b) Fruit ceased growing at 21 days after treatment with 4CPA at anthesis. (c) Fruit at 21 days after treatment with 4CPA at anthesis. (d) Mature fruit after treatment with 4CPA. (e) ~ (l) Pseudoembryos observed with toluidine blue O. (e) At anthesis. An egg apparatus observed. (f) 10 days after anthesis without treatment. (g) 21 days after anthers without treatment, stage 1b. (h) 80 days after anthesis without treatment, stage 2b. (i) The ovule observed in a fruit that dropped at 14 days after anthesis, stage 0. (j) 10 days after 4CPA treatment, stage 2a. Highly stainable cells occupied the ovule cavity and adjoining inner integument degraded. (k) Pseudoembryo at stage 2b in the fruits 21 days after the treatment with 4CPA at anthesis. (l) The pseudoembryo observed in the exceptionally grown fruit (stage 4) at 21 days after anthesis. (e) – (k) x100, (l) x25.

第4節 総合考察

前章において、開花直後から 10 日間の、内生ジベレリンレベルが上昇する期間に、ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールを処理し、開花直後の早い時期の処理によって着果や果実肥大が強く抑制され、同時に偽胚の発達も阻害されることを明らかにした。このようなウニコナゾールによる果実肥大と偽胚発達の阻害は、非単為結果系統‘強力旭光’のオーキシン誘導単為結果果実では緩やかであった。

そこで、偽胚と果実の発達程度の対応関係を明らかにしようとして、非単為結果性経済品種‘強力旭光’の開花後異なる時期に 4 CPA 処理を行った。処理をするまでは開花前と同程度の大きさだった子房が、処理後速やかに肥大を開始した。このとき胚珠を観察すると、4CPA 処理までは珠皮最内層細胞の肥厚は起こるが、珠皮最内層の細胞分裂および珠皮の消化崩壊は起こっておらず、4CPA 処理のあと、分裂が開始し、偽胚が発達することが明らかとなった。4CPA 処理前の‘強力旭光’で見られた偽胚は、ウニコナゾールによって肥大を抑制した‘Severiain’で観察された stage 1b の偽胚とほとんど同じ形態であった。この stage 1b の偽胚は珠皮最内層の細胞が肥厚したものの、分裂せずに停止してしまい、分裂活性が低下している状態であると考えられる。

トマト有種子果の果実肥大においては、発達した種子数と最終的な果実重の間に正の相関関係があるが、果実全体の測定では、内生オーキシンがピークに達するのは果実肥大率のピークの後であることから果実肥大は種子から供給されるオーキシンによるものではなく、種子の発達によって形成されるシンク活性によっているとされている (Varga and Bruinsma, 1976)。種子の内生オーキシン含量は果皮および胎座と比較して非常に高く、そのピークがトルペド胚の段階にある開花後 2 週間前後であるのに対して、果皮の内生オーキシン含量のピークはそれよりも前に現れる (Hochoer et al., 1992)。一方、トマトの果皮細胞数は開花後約 1 週間から 10 日で最高に達し、それ以降は細胞の体積増加によって果実重が増えていく (Mapelli et al., 1978) とされ、細胞分裂が果皮の内生オーキシンの含量のピークと対応していることになる。Varga and Bruinsma (1990)はキュウリおよびガーキンを用いて非単為結果性系統と単為結果性系統を比較し、単為結果性系統では開花前から偽種子の発達が始まっており、最終的な大きさは真の種子の 4 割程度ではあるが、開花前から開花後 1 週間、種子と同様に伸長していることが、単為結果に必要なシンク活性を形成していると推測している。キュウリの偽種子中の組織は、組織学的な由来はトマトと異なると考えられるが、

種子の代役として開花前から肥大初期に働いている点で、トマトと共通していると思われる。また、受粉なしで種子を含む長い莢果を発達させるアラビドプシスの *fis* 変異系統 (fertilization-independent seed) について、胚珠内に多細胞化した胚乳組織ができていることが報告されている (Chaudhury et al., 1997)。同様にアラビドプシスの *fie* 変異系統 (fertilization-independent endosperm) では、除雄した果実 (莢) は野生型の 40% 程度まで成長し、莢の中にはたくさんの種子様組織があり、珠皮は正常に種皮に発達し、中心核が多核の胚乳を形成することが観察され、この発達しつつある胚乳からのシグナルが、珠皮を種皮に、子房を果実に誘導すると考えられている (Ohad et al., 1996)。カキの無核品種である‘平核無’では、受精しなくても珠心や珠皮がある程度まで発育し、また、受精した後胚の発育が停止する場合でも球状あるいはハート型胚までは生長する (傍島ら, 1975)。

トマトの偽胚を形成する珠皮最内層の細胞は、他の部分から容易に見分けられる一列の細胞層で、他の部分の珠皮細胞よりも大きく、良く染色され、機能活性が高いことを示している。受精した場合、受精胚の細胞分裂の開始に伴って、珠皮最内層は珠皮細胞の消化を始め、内乳に分配していると考えられている。開花後約 10 日から 14 日の間、果実肥大率は最大になり、珠皮はもっとも厚くなり、内側の部分がさかんに消化され、その後内珠皮は痕跡になってしまう。胚珠が成熟するに従い、珠皮最内層の細胞はだんだん小さくなり、ひとつひとつが離れるようになる (Smith, 1935)。このことから珠皮最内層は、本来活性が高く、周囲の細胞を消化する能力を持っており、オーキシン処理によって、分裂を開始し、偽胚を形成して、受精果実と同様に珠皮の消化と変形を進行させているのではないだろうか。

偽胚は、発達を開始してから 10 日から 15 日まで増殖し、それ以降は萎縮していった。この偽胚の発達する期間が果皮の細胞分裂時期に相当し、偽胚の衰弱と同時に果皮の細胞分裂期が終わり、細胞肥大期に移行すると推察された。‘強力旭光’のような非単為結果性の一般的な品種では、開花時の子房および胚珠は、受精またはオーキシン処理のような刺激によって誘導されるまで、生長を開始しない。しかし、単為結果性を示す系統では、外からの刺激なしで自発的に生長が開始する。本実験で用いた‘MPK-1’では開花以前に子房の肥大と偽胚の発達が起こっていた。‘Severianin’においても開花後すぐに子房の肥大と偽胚の発達が開始する (第 2 章)。

開花後受精しないまま落果した子房の胚珠の内部構造をみると、非単為結果性品種‘強力旭光’および単為結果性非肥大系統‘HOK-12’の両品種とも開花時と同じ形態であり、珠皮最内層の細胞が肥厚したり、分裂したりした様子は認められなかった。また、生長しない

まま着果している‘HOK-12’の胚珠では珠皮最内層の細胞が大きくなっており、80日間着果していた果実の胚嚢内は大きくなった珠皮最内層由来の細胞で充満していた。染色性は低く、この時点での活性は低いが、このわずかな生長が果実を落果せずに保持するために必要であったことを示していると思われる。また、肥大を途中でやめた‘HOK-12’の果実では、果実肥大が起こっている間は染色性の高い分裂しつつある偽胚が存在し、肥大が停止しからは染色性が低下した偽胚に変わっていた。

このように、非単為結果性品種‘強力旭光’だけでなく、非常に強い単為結果性を示し、開花前から肥大を始める系統‘MPK-1’および非肥大性単為結果系統‘HOK-12’のいずれのトマトにおいても果実肥大と偽胚の発達段階との間には共通する密接な対応関係が認められた。これらの結果を総括すると、偽胚の発達と果実肥大の過程を珠皮最内層の分裂・活性によって4タイプに分けることができる(第3-6図)。すなわち、珠皮最内層の細胞が変化しない(偽胚不形成)場合、子房は落果してしまう。細胞が肥厚し、いくらか分裂するが染色性が低く、活性の低い状態でとどまっている(未発達の偽胚)場合、子房は落果しないがそれ以上肥大することもできない。珠皮最内層の細胞の活性が高く、盛んに分裂して大きな細胞塊を形成する(発達型の偽胚)場合、子房は有種子果と同等まで肥大した果実になる。この偽胚の発達が途中で停止する(発達停止型の偽胚)と、その時点で果実肥大は停止し、果実はごく小型になる。

非肥大性単為結果系統‘HOK-12’において、4CPA処理は、開花時の状態をとまっている偽胚の発達と果実肥大の双方を刺激してその過程を進行させたが、完全な果実形成までを誘導することはできなかった。偽胚の発達は処理後10日目にstage 3まで進行しており、外生オーキシンの効果はこの時点までであったと考えられる。

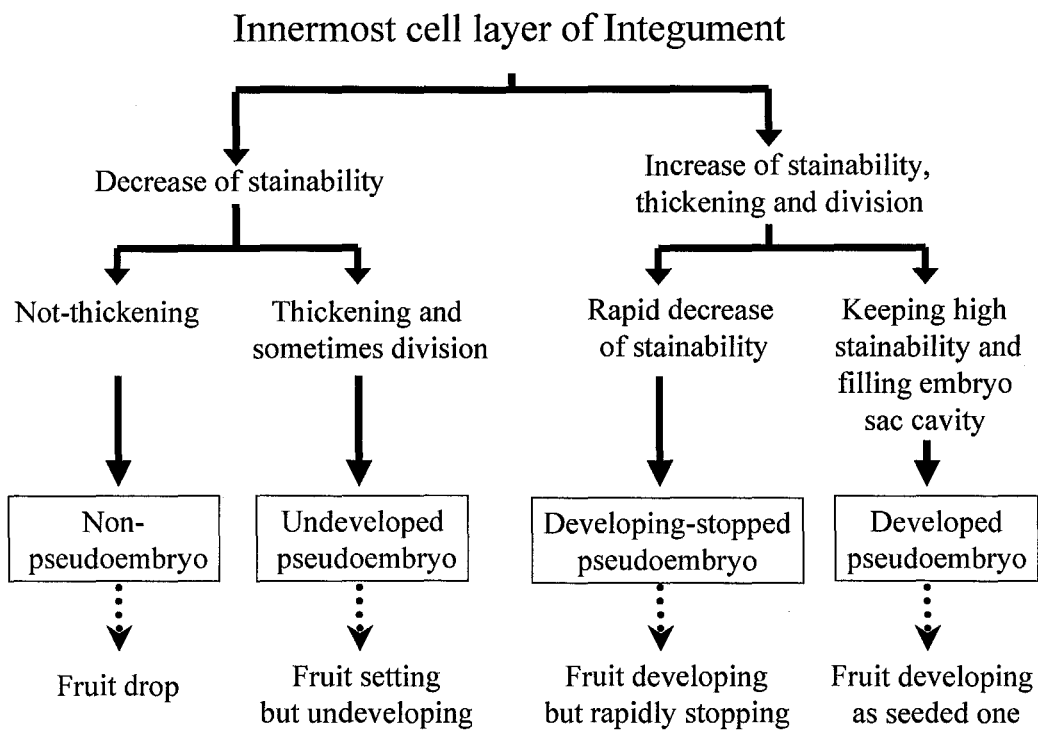


Fig.3-6. The relationship between the development of innermost cell layer of integument and the growth of parthenocarpic fruit in tomato.

第5節 摘要

‘強力旭光’を供試し、オーキシン処理時期について検討したところ、処理をするまで子房は肥大せず、胚嚢内部には未発達偽胚があったが、処理をすると子房は速やかに肥大を開始し、同時に胚嚢内部に発達した偽胚が観察された。

‘Severianin’をもとにした交配から育成した非常に強い単為結果性を示す‘MPK-1’系統は、開花前から子房が肥大しており、胚嚢内部には発達した偽胚が認められた。

‘MPK-1’をもとにした交配後代から見つかった、単為結果するがほとんどの果実が肥大しない‘HOK-12’系統において、肥大しない果実では未発達偽胚が観察された。高濃度のオーキシンを処理すると肥大が開始するが、その後ほとんどの果実では肥大が停止した。肥大中の果実では発達型偽胚が観察されたが、肥大を停止した果実では偽胚の活性が低下してしていた。肥大した果実ではよく発達した偽胚が観察された。

これらの結果を通して、偽胚の発達と果実肥大との間には、密接な対応関係が認められ、珠皮最内層の分裂・活性によって、1：珠皮最内層の細胞が変化しない（偽胚不形成）場合、子房は落果してしまう、2：細胞が肥厚し、いくらか分裂するが染色性が低い（未発達偽胚）場合、子房は落果しないがそれ以上肥大することもできない、3：珠皮最内層の細胞の活性が高く、発達した偽胚を形成する場合、子房は有種子果と同等まで肥大した果実になる、4：偽胚の発達が途中で停止すると、その時点で果実肥大は停止し、ごく小型の果実になる、の4タイプに分けられた。このことは発達している種子による強力なシンク活性に替わるものとして、果実肥大の初期過程に偽胚が働いている可能性を示唆すると考えられた。

第4章 総括

本研究では、トマト果実が着果・肥大していく過程を制御している機構の一端を明らかにしようとして、果実発育における生長調節物質の制御を介し、遺伝的単為結果およびオーキシン誘導単為結果における果実肥大を組織学的に検討した。

まず、合成サイトカイニンであるホルクロルフェニユロンを用い、過剰な合成オーキシンの影響下で外生的にサイトカイニンを供与することで空どう果発生抑制を試み、オーキシン処理液にサイトカイニン活性物質 CPPU を混合して花房散布することで、果実重を減少させることなく空どう果発生を抑制できることが明らかとなった。同時に、形態的観察から、CPPU 処理による空どう果発生抑制は、果心部の肥大、子房壁および隔壁の細胞数の処理直後の増加によるものと考えられた。子房壁および隔壁の細胞の大きさはむしろ小さく、CPPU 処理効果が細胞分裂の促進と過剰オーキシンによる細胞の肥大を抑制することによるものである可能性が示唆された。また、CPPU はがくから果梗部の肥大を顕著に促進し、特に皮層細胞の肥大および木部細胞の分裂を促進していた。

次に、ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾールと GA_3 の処理との組み合わせによって内生ジベレリンレベルを制御した場合の果実発育と偽胚の発達について、*pat-2* による遺伝的単為結果性品種 ‘Severianin’ および非単為結果性の経済品種 ‘強力旭光’ を供試し、トマト単為結果果実の果実肥大におけるジベレリンの関与について検討した。‘Severianin’ の果実肥大初期の主な内生ジベレリンとして GA_{19} および GA_{20} の活性が認められたが、ウニコナゾールの浸漬処理によって処理後 3 日目にはほとんど検出されないほどに低下し、4 週間目まで回復しなかった。このウニコナゾールの花房浸漬処理は着果率を低下させ、果実肥大を抑制すると同時に偽胚の発達も抑制した。

濃度を 2 段階とした GA_3 をウニコナゾール処理後の異なる時期に与え、ある一定の期間における内生ジベレリンレベルを制御し、ジベレリンの影響を検討した。開花時にウニコナゾール (5 mg l^{-1}) が施与された場合、引き続いての GA_3 処理は 5 mg l^{-1} 濃度で抑制効果に打ち勝つのに十分であるが、開花後 3 日目のウニコナゾール処理の場合、 5 mg l^{-1} の GA_3 では十分ではなく、さらに高い 50 mg l^{-1} の濃度が必要であった。すなわち、果実生長には、受粉果実でいえば果皮および胎座の細胞分裂期および胚発達の初期（内珠皮の細胞分裂）にあたる開花後 3 日から 5 日の高い内生ジベレリンレベルが必要であることを示した。

胚珠の経時的観察から、珠皮最内層の分裂と染色活性および内珠皮の崩壊を主な基準として偽胚の発育段階を分類し、それをもとにウニコナゾールとジベレリンとの組み合わせ処理が偽胚発達へ及ぼす影響を検討した。偽胚の形成は、珠皮最内層の細胞の伸長から始まる。珠皮最内層の細胞が胚嚢内部へ向かって細胞分裂を始めると同時に、内珠皮細胞の崩壊が胚嚢側から始まる。胚嚢内で分裂した細胞は層を形成した後やがて胚嚢内部に充満し、同時に内珠皮の崩壊、消化が進行する。この偽胚は果実肥大後半には萎縮し、退化してしまう。開花直後ウニコナゾール処理によって落果した果実では珠皮最内層の肥厚は認められず、また初期の処理によって肥大を抑制された果実の胚珠では偽胚の発達は抑制されており、偽胚の発達程度と果実肥大程度はよく同調していることが示された。非単為結果性品種‘強力旭光’では、ウニコナゾールによる果実肥大抑制程度が、‘Severianin’の場合よりも小さかったが、偽胚の発達程度と果実肥大程度は‘Severianin’同様、よく同調していることが示された。

このようにウニコナゾールによって内生ジベレリンを制御した場合、トマト単為結果果実における偽胚の発育と果実肥大の同調性が見られることから、次に、オーキシン処理の時期の違いによって果実肥大を制御した場合や、異なる果実発達の様相を示す遺伝系統を用いて、偽胚の発達と果実肥大の同調性について検討した。非単為結果性経済品種‘強力旭光’を供試し、開花後異なる時期に4CPA処理を行ったところ、処理をするまでは開花前と同程度の大きさだった子房が、処理後速やかに肥大を開始した。このとき胚珠を観察すると、4CPA処理までは珠皮最内層細胞の肥厚は起こるが、珠皮最内層の細胞分裂および珠皮の消化崩壊は起こっておらず、4CPA処理のあと、分裂が開始し、偽胚が発達することが明らかとなった。また、‘Severianin’をもとにした交配から育成した非常に強い単為結果性を示す‘MPK-1’系統は、開花前から子房が肥大しており、胚嚢内部にはすでに発達した偽胚が認められた。‘MPK-1’系統をもとにした交配後代から見つかった、単為結果するがほとんどの果実が肥大しない‘HOK-12’系統において、肥大しない果実では未発達の偽胚が観察された。高濃度のオーキシンを処理すると肥大が開始するが、ほとんどの果実でしばらく肥大した後、停止した。肥大中の果実では発達した偽胚が観察されたが、肥大を停止した果実では偽胚の活性が低下してしていた。肥大を続けた果実ではよく発達した偽胚が観察された。

どの品種・系統においても、偽胚の発達と果実肥大との間には密接な対応関係が認められたので、珠皮最内層の分裂・活性と果実肥大との関係は、1：珠皮最内層の細胞が変化しな

い（偽胚不形成）場合、子房は落果してしまう、2：細胞が肥厚し、いくらか分裂するが染色性が低い（未発達の偽胚）場合、子房は落果しないがそれ以上肥大することもできない、3：珠皮最内層の細胞の活性が高く、発達した偽胚を形成する場合、子房は有種子果と同等まで肥大した果実になる、4：偽胚の発達が途中で停止すると、その時点で果実肥大は停止し、ごく小型の果実になる、の4タイプに整理することができた。このことは発達している種子による強力なシンク活性に替わるものとして、果実肥大の初期過程に偽胚が働いている可能性を示唆すると考えられた。

謝辞

本研究の遂行にあたって、京都大学大学院農学研究科教授 矢澤 進博士より終始適切なご指導と暖かなご鞭撻をいただき、また深甚なる御校閲を賜りました。ここに心より感謝申し上げます。また、この研究の端緒を与えてくださいました京都大学名誉教授浅平 端博士（故人）に心より感謝の意を表します。

研究を進める過程では、野菜・茶業試験場栽培部生理第 2 研究室において野中瑞生主任研究官（現近畿中国四国農業研究センター傾斜地総合研究官）に栽培技術から分析手法にいたるまでご指導をいただきました。厚くお礼申し上げます。同じく野菜・茶業試験場では、栽培や実験に真川せつ子さんの多大なご援助をいただきました。

また、この研究と一緒に進めてくださった伊達修一君（現京都府立大学助手）、後藤丹十郎助手（現岡山大学農学部助教授）、珠家幹緒君（現明治製菓）、上町あずささん、喜多智子さん（現ハウス食品）、置田 瞳さん、水田洋一助手をはじめとする、京都大学農学部蔬菜花卉園芸学研究室（現京都大学大学院農学研究科蔬菜花卉園芸学専攻）ならびに京都大学大学院農学研究科附属農場の諸先輩、同僚、学生の皆さんに多大なご援助をいただきました。心よりお礼申し上げます。

最後に、終始、私の研究生生活を支持し、応援してくれた亡き夫、片岡丈彦にここに感謝をささげたいと思います。

引用文献

- Abad, M. and A. A. Monteiro. 1989. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: A review. *Scientia Hort.* 38:167-192.
- Abdel-Rahman, M., T. H. Thomas, G. J. Doss and L. Howell. 1975. Changes in endogenous plant hormones in cherry tomato fruits during development and maturation. *Physiol. Plant.* 34:39-43.
- Asahira, T and T. Hosoki. 1977. In vitro studies of controlling tomato puffiness by growth regulators. *Scientia Hort.* 7:319-328.
- Asahira, T., Y. Takeda., T. Nishio, M. Hirabayashi and Y. Tsukamoto. 1967. Studies on fruit development in tomato. I. Ovule development and content of diffusible auxin in synthetic auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits in relation to their development. *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.* 28:47-74.
- Asahira, T., H. Takagi, Y. Takeda and Y. Tsukamoto. 1968. Studies on fruit development in tomato. II. Cytokinin activity in extracts from pollinated, auxin- and gibberellin- induced parthenocarpic tomato fruits and its effect on the histology of the fruit. *Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.* 29:24-54.
- Bohner, J. and F. Bangerth. 1988. Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiol. Plant.* 72:316-320.
- Bünger-Kibler, S. and F. Bangerth. 1982/1983. Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul.* 1:143-154.
- Chaudhury, A. M., L. Ming, C. Miller, S. Graig, E. S. Dennis and W. J. Peacock. 1997. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4223-4228.
- Ficcadenti, N., A. Sestili, T. Pandolfini, C. Cirillo, G. L. Rotino and A. Spena. 1999. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular*

Breeding 5: 463-470.

Fos, M., F. Nuez and J. L. García-Martínez. 2000. The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.* 122:471-479.

福田裕穂. 1990. 組織分化. 現代植物生理学 3 生長と分化 (柴岡弘郎編). p.94-112. 朝倉書店. 東京.

Fukuda, H. 1997. Tracheary element differentiation. *The Plant Cell* 9:1147-1156.

García-Martínez, J. L., M. Martí, T. Sabater, A. Maldonado and Y. Vercher. 1991. Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiol. Plant.* 83:411-416.

Gillaspy, G., H. Ben-David and W. Gruissem. 1993. Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell* 5:1439-1451.

早田保義・新美善行・牧田勝紘・磯田竜三. 1990. メロン果実の着果及び糖蓄積に及ぼすサイトカイニンの影響. 園芸学会雑誌 59 (別 1) : 370-371.

早田保義・新美善行・岩崎直人・青木真一. 1991. スイカの単為結果誘起及び着果促進に関する研究 (第 1 報) フルメットの処理効果. 園芸学会雑誌 60 (別 2) : 304-305.

Ho, L. C. and D. Hewitt. 1986. Fruit development. p. 201-239. In: J. G. Atherton and J. Rudich (eds.). *The tomato crop*. Chapman and Hall, London.

Hocher, V., B. Sotta, R. Maldiney, M. Bonnet and E. Miginiac. 1992. Changes in indole-3-acetic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. *Plant Cell Reports* 11:253-256.

池田隆政・田辺憲二・伴野 潔・田村文男・木村 靖. 1990. 4PU(フルメット液剤)によるメロンの着果及び果実肥大の促進. 園芸学会雑誌 59(別 2) : 434-435.

岩村 俣. 1994. 化学. p.517-570. 高橋信孝・増田芳雄 (共編). 植物ホルモンハンドブック (上). 培風館. 東京.

Izumi, K., Y. Kamiya, A. Sakurai, H. Oshio and N. Takahashi. 1985. Studies of sites of action of a new plant growth retardant (E)-1- (4-chlorophenyl) -4, 4-dimethyl -2 - (1,2,4-triazol-1-yl)-1-penten-3-ol (S-3307) and comparative effects of its stereoisomers in a cell-free system from *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol.* 26:821-827.

- Kang, H. G., S. H. Jun, J. Kim, H. Kawaide, Y. Kamiya and G. An. 1999. Cloning and molecular analysis of a gibberellin 20-oxidase gene expressed specifically in developing seeds of watermelon. *Plant Physiol.* 121:373-382.
- 加納恭卓. 1992. スイカ果実の発育に関する研究 (第 6 報) 果実中の細胞数増大に及ぼす 4 PU の影響. *園芸学会雑誌* 61 (別 1) : 324-325.
- 片岡圭子・伊達修一・後藤丹十郎・浅平 端. 1994. ホルクロルフエニユロンによるオーキシン誘導単為結果トマト果実の空どう果の発生抑制. *園芸学会雑誌* 63 : 61-66.
- Kojima, K., Y. Tamura, M. Nakana, D. Han and Y. Niimi. 2003. Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regul.* 41:99-104.
- Koshioka, M., T. Nishijima, H. Yamasaki, Y. Liu and M. Nonaka. 1994. Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *J. Hortic. Science* 69:171-179.
- 工藤英夫・藤根勝栄. 1987. ブドウに対する KT-30S の影響. *東北農業研究* 40 : 263-264.
- Kuraishi, S. and R. M. Muir. 1962. Mode of action of growth retarding chemicals. *Plant Physiol.* 38:19-24.
- Ledbetter, C. A. and D. W. Ramming. 1989. Seedlessness in grapes. *Hort. Rev.* 12:159-184.
- Lin, S., W. L. George and W. E. Splittstoesser. 1982. Parthenocarpy and the ability to set fruit under high temperature conditions. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 32:35-36.
- Lin, S., W. E. Splittstoesser and W. L. George. 1983a. Factors controlling the expression of parthenocarpy in 'Severianin' tomato. *Scientia Hort.* 19:45-53.
- Lin, S., W. E. Splittstoesser and W. L. George. 1983b. A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic tomato fruit of 'Severianin'. *HortScience* 18:75-76.
- Lukyanenko, A. N. 1991. Parthenocarpy in tomato. pp. 167-177. In: G. Kalloo (ed.). *Genetic improvement of tomato*. Springer-Verlag. Berlin.
- Mapelli, S., C. Frova, G. Torti and G. P. Soressi. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* 19:1281-1288.

- Mapelli, S. and G. Torti. 1979. Effects of GA₃ on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. HortScience 14:736-737.
- Mazzucato, A., A. R. Taddei and G. P. Soressi. 1998. The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. Development 125:107-114.
- Murakami, Y. 1968. A new rice seedling test for gibberellins, 'Microdrop Method', and its use for testing extracts of rice and morning glory. Bot. Mag. (Tokyo) 81: 33-43.
- Nawata, E., H. Inden. and T. Asahira. 1985. Effects of CCC on the occurrence of tomato puffy fruits and the endogenous cytokinin activities. Scientia Hort. 26:119-127.
- Nitch, J. P. 1965. Physiology of flowering and fruit development. pp. 1537-1647. In: W. Ruhland (ed.) Handbuck der Pflanzenphysiologie XV/1. Springer-Verlag, Berlin.
- O'Brien, T. P. and M. E. McCully. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne, Australia.
- Ohad, N., L. Margossian, Y. C. Hsu, P. Repetti and R. L. Fischer. 1996. A mutation that allows endosperm development without fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5319-5324.
- 小原 均・井沢純一・加藤 誠・松井弘之・平田尚美. 1991. キウイフルーツ 'ヘイワード' 果実の単為結果誘起について. 園芸学会雑誌 60 (別 1) : 40-41.
- 岡本五郎. 1996. 果実の発育とその調節. 養賢堂. 東京.
- Philouze, J. and B. Maisonneuve. 1978a. Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the soviet variety Severianin. Tomato Genet. Coop. Rep. 28:12-13.
- Philouze, J. and B. Maisonneuve. 1978b. Breeding tomatoes for their ability to set fruit at low temperatures. p.54-64. In: Breeding. Proc. Eucarpia Tomato Working Group (ed.). Genotype and Environment in Glasshouse Tomato. Leningrad, USSR.
- Rebers, M., T. Kaneta, H. Kawaide, S. Yamaguchi, Y. Y. Yang, R. Imai, H. Sekimoto and Y. Kamiya. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. Plant J. 17:241-250.
- Rotino, G. L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer and A. Spena. 1997. Genetic engineering

- of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15:1398-1401.
- 坂 齊. 1994. 植物成長調節剤. p.408-431. 高橋信孝・益田芳雄 (共編). 植物ホルモンハンドブック (下). 培風館. 東京.
- 穴戸良洋・堀 裕. 1989. トマト果実肥大期における光合成産物の転流分配に及ぼす生長調整物質 (4-CPA) の影響. 園芸学会雑誌 58 : 391-399.
- Sjut, V. and F. Bangerth. 1984. Induced parthenocarp - a way of manipulating levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). 2. Diffusible hormones. *Plant Growth Regul.* 2:49-56.
- Smith, O. 1935. Pollination and life-history studies of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cornell Univ. Agri. Exp. Sta. Mem.* 184:3-16.
- 傍島善次・石田雅士・稲葉昭次. 1975. カキ果実の發育に関する研究 (第 2 報) 平無核の種子の發育不全について. 園芸学会雑誌 44 : 1-6.
- 菅原眞治・伊藤克己・高橋尚明・桜井雍三. 1990. 温室トマトへの単為結果性因子の導入 (第 1 報) 温室栽培での素材品種及び F₁ の単為結果性の発現. 愛知農総試研報 22 : 125-131.
- 菅原眞治・榎本真也・大藪哲也・矢部和則・野口博正. 2002. 完熟収穫型単為結果性トマト品種 'ルネッサンス' の育成経過と特性. 愛知農総試研報 34 : 37-42.
- Sugiyama, K. and M. Morishita. 2000. Production of seedless watermelon using soft-X-irradiated pollen. *Scientia Hort.* 84:255-264.
- Takahashi, S., K. Shudo, T. Okamoto, K. Yamada and Y. Isogai. 1978. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-(4-pyridyl) urea derivatives. *Phytochemistry* 17:1201-1207.
- 田中章雄. 1987. 合成サイトカイニン (KT30) の幼果処理によるキウイフルーツの果実肥大に及ぼす影響. 鳥取果樹試研報. 10:21-31.
- Varga, A. and J. Bruinsma. 1976. Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.80.S.:95-104.*
- Varga, A. and J. Bruinsma. 1990. Dependence of ovary growth on ovule development in *Cucumis sativus*. *Physiol. Plant.* 80:43-50.
- Vardy, E., D. Lapushner, A. Genizi and J. Hewitt. 1989. Genetics of parthenocarp in tomato under low temperature regime: II Cultivar 'Severianin'. *Euphytica* 41:9-15.

Vivian-Smith, A., M. Luo, A. Chaudhury and A. Koltunow. 2001. Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* 128:2321-2331.

山口信次郎. 2003. ジベレリン. 植物の生長調節 38:168-177.

山崎肯哉・堀 裕・東 隆夫. 1961. トマト空洞果の発生と空洞化抑制に対するジベレリンの効果. 東海近畿農試研報園芸部 6:38-48.